

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P DE BIOQUÍMICA**

**Perfil enzimático antioxidante en habitantes de Nueva  
Cajamarca – San Martín**

**TESIS**

**para optar al título profesional de Químico Farmacéutico**

**AUTORES**

**Obed Jonatán Ahumada Dávila**

**Michael Jaime Bardales Arroyo**

**ASESOR**

**Elena Rafaela Benavides Rivera**

**Lima – Perú**

**2011**

## **Dedicatorias**

### ***A Dios***

*Por darme la vida y su solidaria compañía en difíciles y gratos momentos.*

### ***A mi madre***

*Por su gran amor, dedicación y apoyo insuperable durante el transcurso de mi vida y por encaminarme hacia un futuro de éxito. Eres la mejor madre del mundo.*

### ***A mi padre***

*Carlos, por su confianza y sus consejos que me motivaron a seguir una formación profesional. Eres un padre excelente.*

### ***A mis Hermanas***

*Lady, por tu amistad, tu apoyo y tus admirables cualidades de enfrentar las cosas, de las cuales aprendí.*

*Nayely, mi pequeña hermanita, por su cariño tan tierno y su gran capacidad para aprender. Ambas son mi motivación.*

### ***A mis familiares***

*A mis abuelitos Felder y Magda por sus sabios consejos y gran apoyo moral.*

*A usted tía Nícida por su apoyo incondicional durante mi formación universitaria.*

*A todos mis familiares que me resulta muy difícil nombrarles en tan poco espacio, sin embargo ustedes saben quiénes son.*

### ***A Nelsita***

*Por tu amor, cariño y comprensión en mis tristezas y alegrías. Siempre estaremos juntos.*

**OBED AHUMADA**

## **Dedicatorias**

*A mi madre Ana María, por su cariño  
diario y por enseñarme que la unión  
familiar es lo primero.*

*A mi padre Jaime por su alegría  
y por sus palabras de aliento  
cuando más lo necesitaba.*

*A mi hermana Jacqueline por su  
tiempo y paciencia para transmitirme  
sus conocimientos.*

*A Dios por darme ésta familia,  
que me enseña que la inteligencia  
debe ir acompañada de valores y  
principios.*

**MICHAEL BARDALES**

## **Agradecimientos**

*A la Dra. Mg. Elena Benavides por  
su gran dedicación a la formación  
de Químicos Farmacéuticos y por  
su apoyo y asesoría en el desarrollo  
de este trabajo.*

*A la Dra. Q.F. Elizabeth Carranza  
por cultivar investigación científica  
de calidad y por su gran apoyo en  
la fase experimental de este trabajo.*

## **Agradecimientos**

*A los miembros del jurado calificador:*

*Dra. María Elizabeth Gonzáles Loayza*

*QF. Amelia Elizabeth Carranza Alva*

*QF. Haydée Zúñiga Cáceres*

*QF. Gustavo Guerra Brizuela*

*Por dedicarles su tiempo a la revisión y calificación de este trabajo  
y por sus valorables aportaciones y sugerencias. También por su gran  
labor como docentes y forjadores de Químicos Farmacéuticos exitosos.*

# SUMARIO

## RESUMEN

## SUMMARY

### I. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 OBJETIVO GENERAL

#### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 1.3 HIPÓTESIS

### II. GENERALIDADES

#### 2.1 RADICALES LIBRES

#### 2.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

#### 2.3 ESTRÉS OXIDATIVO

#### 2.4 DAÑO OXIDATIVO

#### 2.5 RELACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES, PROCESOS DEGENERATIVOS Y EL DAÑO OXIDATIVO

#### 2.6 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

#### 3.2 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

#### 3.3 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA CATALASA (CAT)

#### 3.4 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

#### 3.5 DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA

IV. RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. RECOMENDACIONES

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## RESUMEN

Se determinó los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT); y la concentración de malondialdehído (MDA) como un indicador de la peroxidación lipídica, en eritrocitos de 48 personas aparentemente sanas: 24 residentes de Nueva Cajamarca (Región San Martín) y 24 residentes de Lima.

En los sujetos de Nueva Cajamarca se encontró mayores niveles de actividad de las enzimas: catalasa ( $0,61 \pm 0,10$  k CAT / g Hb) en relación con los de Lima ( $0,57 \pm 0,16$  k CAT / g Hb), ( $p < 0,025$ ) y superóxido dismutasa ( $2142,00 \pm 2685,07$  U SOD / g Hb) que en los de Lima ( $1536,62 \pm 594,18$  U SOD / g Hb), ( $p = \text{NS}$ ) y mayor concentración de malondialdehído ( $11,55 \pm 4,68$   $\mu\text{mol}$  MDA / g Hb) que los obtenidos en Lima ( $11,11 \pm 3,99$   $\mu\text{mol}$  MDA / g Hb), ( $p = \text{NS}$ ).

**Palabras clave:** superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), malondialdehído (MDA), peroxidación lipídica.



## SUMMARY

It was determined the activity levels of antioxidant enzymes: Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the concentration of malondialdehyde (MDA) as an indicator of lipid peroxidation in erythrocytes of 48 apparently healthy people: 24 residents of Nueva Cajamarca (Region San Martin, 856 m above sea level) and 24 residents of Lima (150 m above sea level).

In Nueva Cajamarca subjects found higher levels of activity of the enzymes: catalase ( $0.61 \pm 0.10$  k CAT / g Hb) in relation to those of Lima ( $0.57 \pm 0.16$  k CAT / g Hb), ( $p < 0.025$ ) and superoxide dismutase ( $2142.00 \pm 2685.07$  U SOD / g Hb) than in Lima ( $1536.62 \pm 594.18$  U SOD / g Hb) ( $p = \text{NS}$ ) and higher concentration of malondialdehyde ( $11.55 \pm 4.68$   $\eta$ mol MDA / g Hb) than those obtained in Lima ( $11.11 \pm 3.99$   $\eta$ mol MDA / g Hb) ( $p = \text{NS}$ )

**Key words:** superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), lipid peroxidation.

## INTRODUCCIÓN

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos que lo utilizan. Este elemento desempeña una función importante como aceptor final de electrones durante la respiración celular, pero también constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como Estrés Oxidativo. En la respiración celular el oxígeno no consumido es convertido a especies semirreducidas conocidas como especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que resulta en un cambio de sus estructuras y función <sup>1</sup>.

El estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno producidas por acción metabólica normal, además de varios factores como el hábito de fumar, el exceso o falta de ejercicio y una mala alimentación, contribuyen de manera importante al desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, así como las crónicas degenerativas.

El cuerpo humano utiliza varios antioxidantes para defenderse del ataque de los radicales libres (RL), muchos de los cuales se obtiene de la dieta. Una alimentación basada en el consumo de antioxidantes juega un importante papel en el mantenimiento de la salud porque los antioxidantes endógenos no proveen suficiente protección contra las especies reactivas de oxígeno.

Los RL son neutralizados por acción enzimática y no enzimática. La acción enzimática es ejercida por enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), entre otras. En cambio la neutralización no enzimática la realizan numerosos antioxidantes como las vitaminas A, C y E, glutatión, compuestos fenólicos, etcétera <sup>2</sup>.

Además de los RL de producción interna, están los externos: productos químicos presentes en el aire, el agua y los alimentos, humos, exposición a los rayos ultravioleta, etc. Actualmente, la exposición de los humanos a los RL es mayor que nunca, debido al mayor

grado de contaminación. Por eso es tan importante contar con fuentes externas de antioxidantes, que nos ayuden a conseguir ese equilibrio <sup>3</sup>.

El ejercicio puede modificar el balance entre las especies oxidantes y antioxidantes. Si bien en un comienzo se propuso que, debido al aumento del metabolismo, el ejercicio induciría un incremento de la liberación de especies reactivas con el consiguiente daño a las proteínas, ADN y lípidos, investigaciones mas recientes indicaron que el ejercicio induce especies radicales que son importantes en el proceso adaptativo. Por ejemplo, el entrenamiento aumenta algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, puede incrementar los niveles de agua y de lípidos solubles endógenos, y antioxidantes como el ácido ascórbico y el alfa tocoferol <sup>4</sup>.

El distrito de Nueva Cajamarca se encuentra ubicado en la Selva Alta de la Amazonía Peruana, en el Departamento de San Martín. La ciudad tiene un activo movimiento comercial y un gran potencial agrario <sup>5</sup>.

El propósito del presente trabajo es evaluar los niveles de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) como antioxidantes eritrocitarios en sujetos residentes de Nueva Cajamarca (Región San Martín) y comparar los resultados con sujetos residentes de Lima. Adicionalmente se evaluará la concentración de malondialdehído (MDA) como un indicador de la peroxidación lipídica en ambos grupos de estudio.

Con el presente estudio se pretende aportar al mejor conocimiento de los mecanismos de defensa celular de los habitantes de Nueva Cajamarca ante el estrés oxidativo.

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

- Comparar los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes en sujetos que viven en el Distrito de Nueva Cajamarca – Región San Martín y en sujetos que viven en Lima

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los niveles de actividad antioxidante de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos.
- Determinar los niveles de malondialdehído (MDA) como indicador de la peroxidación lipídica en eritrocitos.

### **1.3 HIPÓTESIS**

- Los sujetos residentes en el Distrito de Nueva Cajamarca – Región San Martín, poseen niveles mayores de respuesta antioxidante en comparación con los sujetos residentes en Lima.

## II. GENERALIDADES

### 2.1 RADICALES LIBRES

Se considera un radical libre (RL) a una entidad química de átomo o molécula que presenta un electrón desapareado en el orbital externo y puede tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Una molécula se convierte en radical libre al perder o ganar un electrón <sup>6, 7</sup>. Los radicales libres son átomos, por lo general de oxígeno, altamente reactivos e inestables; que se liberan cuando el alimento es metabolizado en nuestra células para producir energía y son inactivos por mecanismos enzimáticos y otros de atrapamiento <sup>8</sup>. Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida media es normalmente muy corta. La Tabla 2 muestra ejemplos de la vida media de algunos radicales libres <sup>9, 10</sup>.

**Tabla 1. Especies Reactivas (RS) modificado de: Haliwell B <sup>9</sup>.**

	<b>RADICALES LIBRES</b>	<b>NO RADICALES</b>
<b>ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO</b>	Superóxido: $O_2^{\bullet-}$ Hidroxilo: $OH^{\bullet}$ Hidroperóxido: $HO_2^{\bullet}$ Carbonato: $CO_3^{\bullet-}$ Peróxilo: $RO_2^{\bullet}$ Alcoxi: $RO^{\bullet}$ Radical de dióxido de carbono: $CO_2^{\bullet}$ Oxígeno de orbital único	$H_2O_2$ Ácido hipobromoso: $HOBr^a$ Ácido hipocloroso: $HOCl^b$ Ozono $O_3$ Oxígeno de orbital único $O_2^{-1}$ Peróxidos orgánicos: $ROOH$ Peróxinitrito: $ONOO^{-d}$ Peróxinitrato: $O_2NOO^{-d}$ Ácido Peróxinitroso: $ONOOH^d$ Peroxomonocarbonato: $HOOC O_2^{-2}$
<b>ESPECIES REACTIVAS DE CLORO</b>	Átomo clorinado: $Cl^{\bullet}$	Ácido hipocloroso: $HOCl^b$ Nitrilo clorado: $NO_2Cl^a$ Dióxido clorinado: $ClO_2$ Cloraminas
<b>ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO</b>	Óxido nítrico Dióxido de nitrógeno Radical nitrato	Ácido nitroso Catión nitrosido Anión nitroxi Tetróxido dinitrogenado Trióxido dinitrogenado Peroxiacetal nitrato

**Tabla 2. Vida Media de Algunos Radicales Libres<sup>18</sup>.**

<b>RADICAL</b>	<b>SUSTRATO</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>VIDA MEDIA (A 37°C)</b>
HO•	LH <sup>C</sup>	1 M	10 <sup>-9</sup> seg.
RO•	LH	100 mM	10 <sup>-6</sup> seg.
ROO•	LH	1 mM	7 seg.
L•	O <sub>2</sub>	20 µM	10 <sup>-8</sup> seg.
Q <sup>-</sup> •		-	Días

### 2.1.1 El oxígeno

El oxígeno se encuentra en la naturaleza mayoritariamente en forma molecular o diatómica (O<sub>2</sub>), contiene 16 electrones distribuidos correspondientemente en sus distintos orbitales según la teoría de los orbitales moleculares (TOM). La estructura termodinámicamente más estable de la molécula forma una distribución electrónica de forma que deja desapareados dos electrones en la capa de valencia, por lo que le capacita para reaccionar eficazmente con radicales libres, aunque su velocidad de reacción con especies radicalarias suele ser baja. Esta configuración está considerada por algunos autores como un radical libre<sup>18</sup>.

El oxígeno diatómico es una forma muy abundante en la naturaleza debido a que es una molécula estable. Sin embargo, existe un gran número de especies derivadas del oxígeno que, o bien son muy reactivas, o bien son capaces de dar lugar a especies reactivas, ver Tabla 1. Algunas de estas especies son auténticos radicales libres derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo. Otras como el peróxido de hidrógeno, no son en realidad radicales en el sentido estricto de su definición.

Además existen otras especies radicalarias no derivadas del oxígeno que están tomando interés en los últimos años, como las derivadas del nitrógeno (RNS), ver Tabla 1.

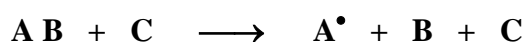
Tal y como veremos a continuación, las especies del oxígeno y de los radicales libres en la fisiopatología son: el mismo oxígeno, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, los iones de metales de transición, el radical hidroxilo, entre otros. El radical hidroxilo es

producto de formación de una multitud de reacciones en las que participan los cuatro primeros compuestos mencionados <sup>18</sup>.

### 2.1.2 Producción de Radicales Libres:

Las reacciones producidas por radicales libres suelen ser procesos en cadena, en los cuales se pueden distinguir tres etapas: Iniciación, Propagación y Terminación <sup>11</sup>.

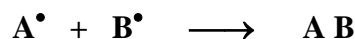
En las reacciones de **Iniciación**, un radical se forma a partir de una especie química estable no radical:



En la **Propagación**, un radical libre reacciona con una molécula estable:



En la **Terminación** dos radicales libres comparten sus electrones desapareados y originan un producto estable.



### 2.1.3 Fuentes Biológicas de Radicales Libres

#### 2.1.3.1 Mitocondria

Es la principal fuente de radicales libres, este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP o adenosín trifosfato <sup>13</sup>. Una consecuencia directa de este proceso de fosforilación oxidativa es que, entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación.

Algunas de ellas pueden entregar uno o dos electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres <sup>14</sup>.

#### **2.1.3.2 Peroxisomas**

Son organelos del citosol muy ricos en oxidasas y que generan  $H_2O_2$ , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua <sup>13</sup>.

#### **2.1.3.3 Leucocitos Polimorfonucleares:**

Cuando son activados por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos, los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de  $O_2$  que en presencia de hierro se transforma en  $OH^-$ , que es altamente tóxico <sup>13, 15</sup>.

#### **2.1.3.4 Xantina Deshidrogenasa:**

Predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas. Es muy importante en las células endoteliales, miocardio y otros tejidos <sup>13</sup>.

#### **2.1.3.5 Retículo Endoplasmático:**

Los citocromos sufren reacciones de autooxidación con formación de radicales libres  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  <sup>13</sup>.

#### **2.1.3.6 Membrana Plasmática:**

Por acción de la lipooxigenasa y la prostaglandina sintetasa dentro de las reacciones inflamatorias mediadas por el ácido araquidónico <sup>15-17</sup>.

También existen fuentes exógenas de radicales libres como xenobióticos, humo del cigarro, drogas como la adriamicina, radiaciones ultravioleta, ciertos componentes de la dieta



(sales de hierro y cobre y compuestos fenólicos), traumatismos, procesos inflamatorios, ejercicios extenuantes, estados de hiperoxia, entre otros <sup>12</sup>.

## **2.1.4 Clasificación de radicales libres**

### **2.1.4.1 Radicales libres inorgánicos o primarios**

Se originan por la transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados de reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico.

### **2.1.4.2 Radicales libres orgánicos o secundarios**

Se generan por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, tienen una vida media más prolongada que los primarios.

### **2.1.4.3 Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno**

Se incluye el grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadas de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, e hidroperóxidos orgánicos <sup>12</sup>.

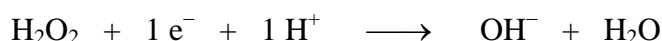
## **2.1.5. Formación de Radicales libres**

De todos los radicales, resultan de gran interés las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), debido a la estructura birradical de esta molécula y al gran número de procesos en los que puede verse involucrado <sup>18</sup>.

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a agua a través de reacciones enzimáticas, pero del 2 al 5 % escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de especies de oxígeno parcialmente reducidas, denominadas

también especies reactivas de oxígeno (ERO), oxiradicales o intermediarios de la reducción del oxígeno. Últimamente prefiere llamárseles ERO, para agrupar a algunos compuestos que como el peróxido de hidrógeno, no constituyen un verdadero radical <sup>11</sup>.

Las ERO se originan a través de una serie de transferencias monoelectrónicas:



Como podemos ver, la reducción monoelectrónica del oxígeno da lugar al radical anión superóxido, la dielectrónica al peróxido de hidrógeno y la trielectrónica al radical hidroxilo. Las especies reactivas explicadas hasta ahora no son las únicas, existen otras como el peroxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) y el alcóxil ( $\text{RO}^\bullet$ ). También existe el Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), el anión peroxinitrito ( $\text{OONO}^\bullet$ ) y el ión hipoclorito ( $\text{OCl}$ ) formado a partir del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la enzima mieloperoxidasa <sup>11</sup>.

Existen muchas clases de radicales libres, tanto especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) como las especies reactivas del nitrógeno (ERN). Algunos de los radicales libres más importantes son:

#### 2.1.5.1 Anión Superóxido ( $\text{O}_2^-$ )

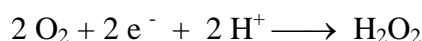
Estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en reacciones catalizadas enzimáticamente, como producto en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. En las oxidasas e hidroxilasas

(diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.), también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína o la riboflavina. Asimismo, en la cadena respiratoria mitocondrial es potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Se ha estimado que una célula del cuerpo humano produce alrededor de unas  $10^{10}$  moléculas de anión superóxido por día. Sin embargo, el 99 % de las moléculas que se producen se dismutan hacia peróxido de hidrógeno <sup>18</sup>.

#### 2.1.5.2 Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos activa de las especies reactivas del oxígeno. Su importancia recae en el hecho de que atraviesa fácilmente las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción. Se puede originar a partir de diversas fuentes:

- Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones.



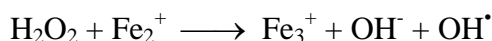
- Por dismutación del O<sub>2</sub><sup>-</sup>.
- Como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.).
- Por reacciones químicas de autooxidación <sup>18</sup>.

#### 2.1.5.3 Radical Hidroxilo (OH<sup>•</sup>)

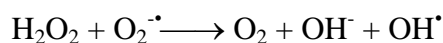
Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de  $10^{-9}$  s.

Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos  $\gamma$ ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo.

Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton.



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss.



Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre <sup>18</sup>.

#### **2.1.5.4 Radical Peroxilo (ROO<sup>•</sup>)**

Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga, del orden de segundos, ver Tabla 2 <sup>18</sup>.

#### **2.1.5.5 Oxígeno Singlete (<sup>1</sup>O<sup>2</sup>)**

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre como tal. Se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10<sup>-6</sup> segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas o en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras <sup>18</sup>.

#### **2.1.5.6 Óxido nítrico (NO<sup>•</sup>)**

El óxido nítrico es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina, dando como subproducto NO• en numerosos tipos celulares. Además lo producen los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria.

Interviene en numerosos procesos fisiológicos, actuando como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, neurotransmisor, etc. siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa <sup>18</sup>.

#### **2.1.5.7 Dióxido de Nitrógeno (NO<sub>2</sub>•)**

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO• atmosférico. Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica <sup>18</sup>.

#### **2.1.5.8 Radicales de Átomos Derivados de Carbono (R•)**

Los radicales centrados en un átomo de carbono (R•) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno (H•) de un grupo metileno situado entre dos enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un radical peróxido (ROO•). A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones y generar otras especies radicales <sup>18</sup>.

#### **2.1.5.9 Radicales de Átomos Derivados de Azufre (RS•)**

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre (RS•) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo <sup>18</sup>.

### 2.1.6 Génesis de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), el ozono, el humo del tabaco, la contaminación ambiental, etc. Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno. Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  <sup>18</sup>.

#### 2.1.6.1 Fuentes Exógenas

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

- Muchos agentes **antineoplásicos** tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos **antibióticos** que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- La irradiación de los organismos debido a las **radiaciones electromagnéticas** (rayos X,  $\gamma$ ) o debido a **radiaciones de partículas** (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ).
- **Factores ambientales**, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humos del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación <sup>18</sup>.

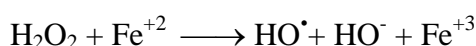
## 2.1.6.2 Fuentes Endógenas

### 2.1.6.2.1 La Cadena de Transporte Electrónico Mitocondrial

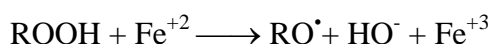
La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres al interior de la célula. Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de ATP <sup>18</sup>.

### 2.1.6.2.2 Reacción de Fenton-Haber-Weiss

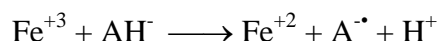
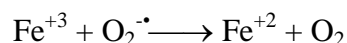
Consiste en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe<sup>+2</sup>) y, en menor medida, el cuproso (Cu<sup>+</sup>) y otros iones. El agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton descubrió, a finales del siglo XIX, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe<sup>+2</sup> (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss los que posteriormente comprobaron cómo el Fe<sup>+2</sup> reduce al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que a su vez se descompone en radical hidroxilo e ión hidroxilo.



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe<sup>+2</sup> se oxida a Fe<sup>+3</sup> con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica. Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato y por el radical superóxido, con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo <sup>18</sup>:



#### **2.1.6.2.3 Los Sistemas de Transporte Electrónico del Retículo Endoplásmico.**

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y B5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos. Bajo la denominación de citocromos P450 se engloba un número muy elevado de proteínas con grupos hemo, ampliamente distribuidos entre los seres vivos. Son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula <sup>18</sup>.

#### **2.1.6.2.4 Fagocitos Activados**

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como mecanismo de defensa frente a microorganismos <sup>18</sup>.

#### **2.1.6.2.5 Microsomas o Peroxisomas**

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan. La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del peróxido de hidrógeno formado en ellos. Por otro lado, el citocromo P450 tiene un papel importante en los microsomas que detoxifican xenobióticos <sup>18</sup>.



#### **2.1.6.2.6 Autooxidación de Pequeñas Moléculas**

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dioxígeno por estas moléculas. Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido, bien espontánea, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD) <sup>18</sup>.

#### **2.1.6.2.7 Enzimas Solubles y Proteínas**

Enzimas como xantina oxidoreductasa, óxido nítrico sintasa, aldehído oxidasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico <sup>18</sup>.

#### **2.1.6.2.8 Membrana Plasmática**

La enzima NAD(P)H-oxidasa, presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio.

Cabe destacar el papel de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos <sup>18</sup>.

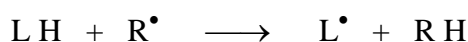
## 2.2 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los lípidos son un grupo heterogéneo de componentes que tienen varias funciones importantes en el cuerpo tales como: fuente eficiente de energía, constituyente de membranas celulares y tejido nervioso, aislante térmico y eléctrico y también actúan como hormonas locales <sup>19</sup>.

El mecanismo de peroxidación lipídica inducida por los radicales libres fue establecido en la década del 40 por Farmer y sus colaboradores. Después, en los años 50, la relevancia de la peroxidación lipídica en sistemas biológicos y medicina empezó a ser explorada <sup>20, 21</sup>. La peroxidación lipídica en membranas biológicas ha sido considerada como uno de los mayores mecanismos de injuria celular en organismos aerobios sujetos a estrés oxidativo <sup>22</sup>.

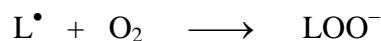
Se denomina Peroxidación Lipídica (o Lipoperoxidación) al proceso de oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA – polyunsaturated fatty acids) son particularmente susceptibles a la peroxidación porque poseen tres o más uniones carbono-carbono con doble ligadura, que le confiere una zona de enlace lábil que permite que una molécula activa como el OH<sup>-</sup> le sustraiga un átomo de hidrógeno. Se trata de una reacción en cadena o autocatalítica, es decir que, una vez comenzada, continúa desarrollándose por sí misma <sup>23</sup>. Por lo tanto, el proceso consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación.

La **Iniciación** es cuando la unión C-H de los PUFA sufre la abstracción del hidrógeno del doble enlace (hidrógeno alílico), lo que genera un radical lipídico. Teniendo el átomo de hidrógeno un solo electrón, la sustracción de hidrógeno del grupo metileno produce un radical ácido graso (L<sup>•</sup>) al dejar un electrón desapareado en el carbono. El inicio se expresa en la siguiente reacción:

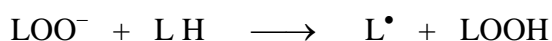


Dónde: LH = PUFA y R<sup>•</sup> = Radical libre derivado de oxígeno.

El radical lipídico resultante ( $L^\bullet$ ) sufre un reordenamiento molecular originando un dieno conjugado, y en presencia de oxígeno molecular da lugar al radical peroxilo ( $LOO^\bullet$ )



El radical peroxilo puede sustraer un átomo de hidrógeno de otra molécula vecina (LH), la cual puede ser otro ácido graso insaturado, formándose así un hidroperóxido ( $LOOH$ ) y un nuevo radical lipídico ( $L^\bullet$ ), entrando la peroxidación en una fase de **Propagación**:



El grado de propagación de la cadena depende de varios factores, entre ellos la concentración de oxígeno, composición de ácidos grasos, relación de lípido-proteína y presencia de antioxidantes.

Los hidroperóxidos son los productos primarios de la lipoperoxidación y en condiciones fisiológicas son relativamente estables, pero su descomposición puede estar estimulada por exposición a metales de transición como sales de cobre o de hierro <sup>24-26</sup>. Los grupos  $-OOH$  de los hidroperóxidos ( $LOOH$ ), localizados en medio de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, llevan a una distorsión del espacio hidrofóbico y a una pérdida de la función biológica de las membranas.

La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a la fase de **Terminación** cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables, al romperse generan aldehídos como el malondialdehído (MDA), que es un indicador de la lipoperoxidación. Cabe señalar que a su vez, en las reacciones de terminación, se da la formación del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) como producto secundario de la lipoperoxidación <sup>27</sup>.

La mayoría de métodos de laboratorio, para determinar el daño por los radicales libres o cuantificar el estrés oxidativo, se basan en la medición de los productos oxidados de los PUFA. Estos métodos incluyen dosaje de MDA, estudio de dienos conjugados, la medición de energía lumínica (fotoemisión que producen las moléculas terminales de la peroxidación lipídica) <sup>24</sup>.

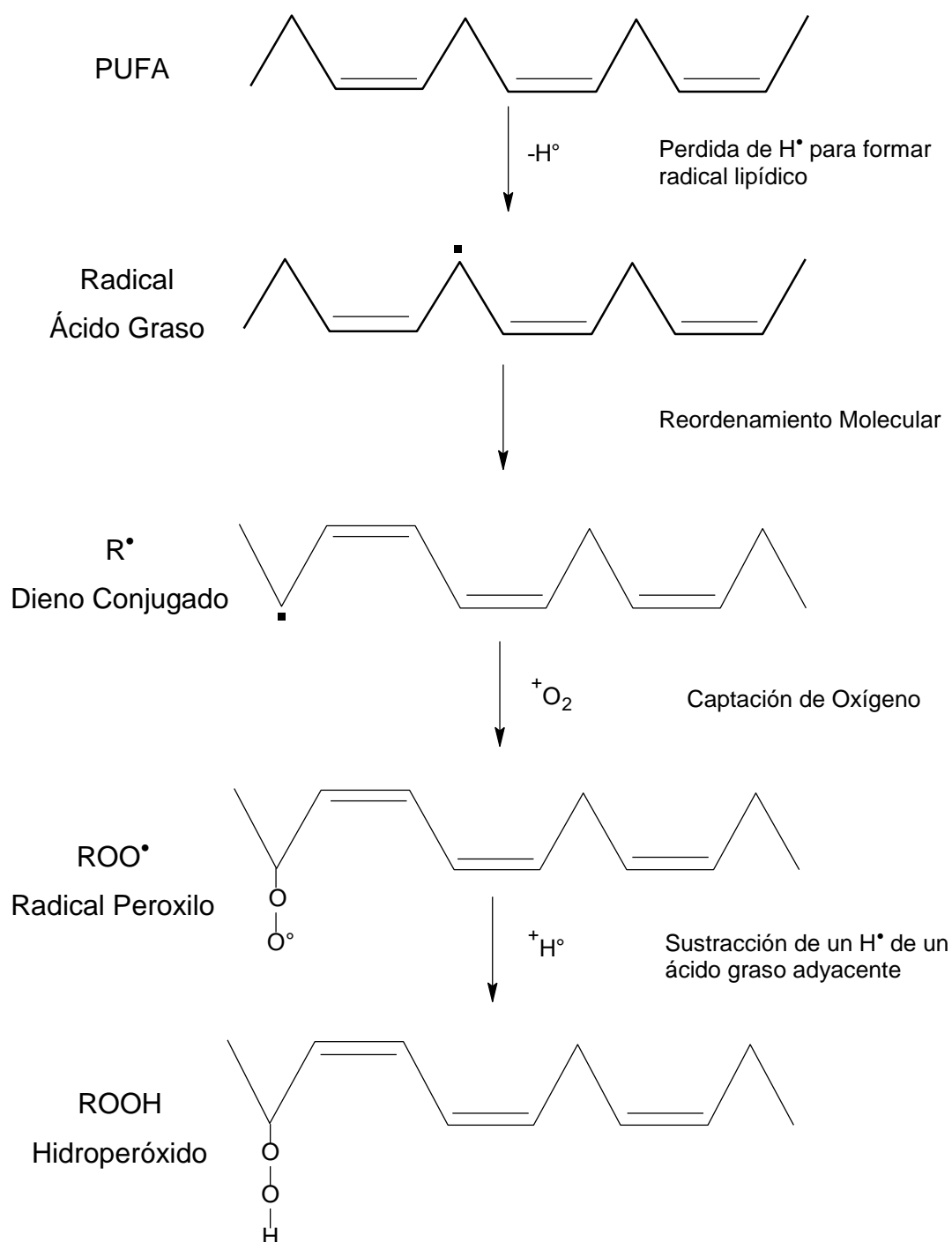


Figura 1: Mecanismo de la Peroxidación Lipídica

## **2.3 ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas. También se define como un desequilibrio entre oxidantes y los mecanismos antioxidantes de los organismos que involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas tal es el caso de algunas vitaminas como la E y la C <sup>28</sup>.

### **2.3.1 Etapas del Estrés Oxidativo**

Con el fin de considerar la intensidad y el grado de afectación en la salud, el proceso de estrés oxidativo puede dividirse en tres etapas (adaptación, aguda y crónica); tomando en consideración las características del daño estructural y funcional ejercido como consecuencia de la reactividad de las diferentes especies reactivas (reto oxidante), así como el tiempo de exposición a las mismas y la evidencia concomitante de modificaciones en los procesos biológicos afectados <sup>28</sup>.

#### **2.3.1.1 Adaptación al Estrés Oxidativo**

Es la respuesta al estrés oxidativo de la célula o del organismo para equilibrar por medio de procesos de sobreexpresión genética y activación enzimática, la sobreproducción de ERO, que han superado a los sistemas antioxidantes naturales, estableciendo las condiciones de estrés oxidativo. El resultado de la adaptación es una protección parcial o total contra el daño, el cual no es cuantificable e incluso puede llegar a crear una condición de resistencia a niveles intensos y constantes <sup>28</sup>.

#### **2.3.1.2 Estrés Oxidativo Agudo**

En ocasiones el estrés oxidante es menos intenso, debido a un desequilibrio menor, su expresión en cambios estructurales y funcionales suele ser más sutil que el proceso crónico,

ya que generalmente es mediado por las ERO menos reactivas como son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); moléculas que a concentraciones y actividades controladas tienen una importante participación fisiológica, pero que al generarse en una proporción mayor a la funcional, afectan las características de procesos intracelulares vitales de regulación y suele acompañar también a procesos crónicos <sup>28</sup>.

#### **2.3.1.3 Estrés Oxidativo Crónico**

Generalmente se trata de un proceso que al ser mediado fundamentalmente por el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), se manifiesta por rompimiento o modificación de biomoléculas (hidroxilación) con la consecuente liberación de una segunda generación de productos de oxidación, que a su vez son moléculas muy reactivas, amplificando y propagando el daño que se manifiesta como daño celular y tisular.

Las moléculas generadas por el daño oxidativo pueden interaccionar con otras biomoléculas, afectándolas en su estructura y función. Algunas modificaciones inducidas por este tipo de estrés oxidativo se reflejan como cambios bioquímicos intracelulares (estrés oxidativo intracelular) y se manifiestan fundamentalmente por alteraciones funcionales locales y sistémicas (hipertensión arterial, arritmias, fibrilación, bronco-constricción, shock).

Tanto en el estrés agudo, como en el crónico, se presentan dos mecanismos de daño, el oxidativo y el no oxidativo (modificación de la homeostasis), la diferencia es que en el agudo, la eliminación del reto oxidante permite la recuperación celular y del organismo; en el crónico, el daño es frecuentemente irreversible <sup>28</sup>.

#### **2.3.2 Indicadores de Estrés Oxidativo**

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, uno de los más relevantes es el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) característico de estrés oxidativo, de modo que un

aumento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración del estado redox celular. Además como indicadores de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído y el hidroxinonenal son los más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano. La 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina es un indicador de daño oxidativo al ADN, los grupos carbonilo y la 2-oxohistidina se utilizan como marcadores de daño oxidativo en proteínas, etc <sup>18</sup>.

En los eritrocitos de todos los mamíferos existen reacciones tipo Fenton y Haber-Weis como consecuencia del intercambio gaseoso que ocurre cuando la oxihemoglobina pasa a ser metahemoglobina, en donde el hierro del grupo hemo de la hemoglobina reacciona en forma espontánea con el oxígeno. Las ERO así formadas reaccionan con las macromoléculas, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana eritrocitaria, en donde se lleva a cabo el fenómeno de la lipoperoxidación que da como metabolito final al malondialdehído (MDA) <sup>29</sup>.

## **2.4 DAÑO OXIDATIVO**

Un estado de estrés oxidativo induce en la célula efectos perjudiciales por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis <sup>28</sup>.

### **2.4.1 Lípidos**

En los lípidos es donde se produce el daño mayor, en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica (LPO), lo cual afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados. La peroxidación lipídica o enranciamiento, se inicia cuando las ERO atacan un ácido graso poliinsaturado (AGP) y le quitan un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical libre acilácido graso. Rápidamente esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un radical libre, peroxilo ácido graso, que actúa

como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros AGP e inicia nuevas reacciones. En tal sentido, éste mecanismo se facilita con la presencia de iones de metales de transición y por los dobles enlaces contenidos en la cadena AGP. Los productos finales de la LPO, son lípidos peroxidados, que al degradarse originan nuevos radicales libres y una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA); aunque se ha comprobado que este último posee una baja toxicidad. Las consecuencias del daño en la estructura molecular del AGP son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares o subcelulares, ya que se altera su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica produciéndose edema y por lo tanto muerte celular. Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: la naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente inicializador, los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro, el contenido celular de antioxidantes (betacarotenos, alfatocoferoles, glutatión, etc.) y la activación de enzimas que pueden hacer terminar la cadena de reacción, como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx) <sup>28</sup>.

#### **2.4.2 Proteínas**

Las proteínas, también constituyen un blanco para las ERO, pero su acción es menos dramática que frente a los lípidos, debido al lento progreso de las reacciones. La oxidación de residuos de los aminoácidos son causados por el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas. El daño oxidativo a las proteínas puede causar la pérdida de la actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrumpir la regulación de las vías metabólicas. La presencia de cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteínica la hacen más vulnerable a los radicales libres. Las proteínas sufren alteraciones localizadas en los sitios ligados a metales de transición. Estos sitios son particularmente susceptibles debido a la facilidad con que los metales ligados reaccionan con el peróxido de hidrógeno para formar iones hidroxilo



los que, posteriormente, atacan a los aminoácidos adyacentes. Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de peróxidos y carbonilos.

Los sistemas de reparación de las proteínas solo se limitan a los residuos de metionina, por lo que las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas para evitar su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas<sup>28</sup>.

### **2.4.3 Ácido Desoxirribonucleico (ADN)**

El ADN también constituye un blanco de ataque por parte de las ERO, principalmente el ADN mitocondrial. Este ADN, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de ERO provenientes de la cadena respiratoria; además, carece de histonas en su estructura, lo que le resta estabilidad. Las ERO, dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. El ADN se fragmenta en presencia de las ERO, y aparecen fragmentos internucleosomales, formados por la ruptura del ADN entre los nucleosomas (estructuras fundamentales para la organización del ADN dentro de los cromosomas) ocasionando con ello, problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina, y con ello, alteraciones en las propiedades funcionales de la misma cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción genética.

Cuando las ERO alcanzan el núcleo o se generan dentro de éste, existen mecanismos de reparación que funcionan de manera eficiente, ya que continuamente revisan que exista una adecuada secuencia de bases en la molécula de ADN, y en caso de que exista alguna mutación (ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases) reparan el daño causado y cuando la modificación del ADN es más extensa, actúa el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, removiendo todo el segmento dañado a través de una nucleasa, para ser remplazado por la ADN polimerasa I y la ligasa<sup>28</sup>.

#### **2.4.4 Los Carbohidratos**

La glucosa y otros monosacáridos relacionados, sufren peroxidación bajo ciertas condiciones y forman compuestos dicarbonílicos y peróxido de hidrógeno. La importancia de este hecho radica en que estas biomoléculas una vez activadas pueden interactuar con otras y conformar nuevas asociaciones moleculares <sup>28</sup>.

### **2.5 RELACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES, PROCESOS DEGENERATIVOS Y EL ESTRÉS OXIDATIVO**

Hay una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de RL, al menos estarían implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas.

Son muchos los procesos patológicos implicados, así como múltiples los descubrimientos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación, por ello sólo es posible recoger unos breves comentarios de algunos de estos procesos patológicos más significativos <sup>11,30</sup>.

#### **2.5.1 El Envejecimiento**

Es difícil diferenciar entre lo que son procesos propios del envejecimiento o procesos patológicos que se desarrollan preferentemente durante el envejecimiento. El envejecimiento y la muerte pueden ser el resultado de la activación de genes específicos en un momento determinado del ciclo celular (apoptosis). La teoría de las ERO en el envejecimiento supone que este resulta de la acumulación de lesiones orgánicas debidas a ERO. También se ha detectado una menor actividad proteolítica que en las células jóvenes, una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de ERO y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas <sup>30</sup>.

### **2.5.2 La Aterosclerosis**

La formación de la placa aterosclerótica se inicia con la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos que se transforman así en células espumosas. Estas células son captadas por el endotelio mediante moléculas de adhesión y se acumulan en el espacio subendotelial, donde inducen la migración de células musculares, su proliferación e hipertrofia. En determinadas condiciones oxidativas las lipoproteínas se fragmentan y se alteran determinados residuos de aminoácidos de la apoproteína de la LDL. Estas LDL oxidadas o productos liberados de ellas, van a tener mayor poder aterogénico ya que son captadas más ávidamente por los macrófagos, son citotóxicas para el endotelio y estimulan la producción de factores vasoactivos, de adhesión, trombóticos y de proliferación de células musculares lisas de la vasculatura, iniciando o extendiendo la lesión aterosclerótica. Se ha demostrado una estrecha relación entre ERO y lipoproteínas de baja densidad (LDL) y se sabe que su aumento tiene un conocido valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis. Muchos factores de riesgo de la aterosclerosis ampliamente identificados, como pueden ser la hipertensión, hipercolesterolemia y tabaquismo, pueden actuar induciendo un desequilibrio entre prooxidación y antioxidación <sup>30</sup>.

### **2.5.3 Cáncer**

El desarrollo tumoral es un proceso altamente complejo caracterizado por la presencia de necrosis celular del tejido sano, crecimiento incontrolado de las células cancerosas, neovascularización del área afectada para asegurar el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, entre otros muchos fenómenos. Se ha sugerido la implicación de los RL en el desarrollo tumoral. El humo del tabaco es el causante del cáncer de pulmón: además de la nicotina y del alquitrán, en el que se encuentran RL en abundancia, que atacan los tejidos y destruyen las sustancias protectoras presentes en ellos, tenemos óxidos radicalarios de nitrógeno que forman con las proteínas carcinógenos como las nitrosaminas. Los RL estimulan el crecimiento de las células musculares lisas, lo que sugiere un papel del estrés oxidativo en la

neovascularización tumoral o angiogénesis. También se ha observado la activación de algunos genes tempranos que podrían participar en el control de la transcripción de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral. Tampoco hay que olvidar que la transformación oncogénica viene condicionada por la presencia de genes mutados u oncogenes que controlan funciones celulares clave, y esto también puede influenciarse por el estado redox celular. Se han detectado niveles disminuidos de enzimas antioxidantes en diversos tipos de células tumorales así como alteraciones en el estado de los tioles celulares. La vitamina C y otros rastillos de los radicales tendrán efecto anticarcinógeno y será importante introducir estrategias antioxidantes para complementar tratamientos anticancerosos<sup>30</sup>.

#### **2.5.4 La Catarata Senil**

El cristalino está sujeto al constante bombardeo de radiaciones diversas causantes de procesos químicos irreversibles, que con el tiempo, por acumulación, producen una creciente opacidad del cristalino; es decir, la catarata. Los RL generados en el cristalino producen entrecruzamiento, desnaturalización, degradación de sus proteínas y otros efectos, formándose gránulos microscópicos de composición compleja por aglutinamiento desordenado de moléculas, que crecen en tamaño y cantidad, produciendo inicialmente el efecto Tindall, y finalmente la total opacidad del cristalino.

#### **2.5.5 Insuficiencia Renal Aguda (IRA), Crónica (IRC) y Diálisis**

El daño tubular por isquemia/reperfusión está, al menos en parte, ocasionado por el aumento del estrés oxidativo de la IRA. Las ERO producen la activación de la enzima xantinaoxidasas y de los neutrófilos, mecanismos importantes del daño renal por isquemia/reperfusión. El NO (óxido nítrico) parece aumentar en la fase isquémica y las ERO en la de reperfusión, por lo que el balance NO/ERO condicionará la magnitud del daño, así como los donantes de NO tendrán un potencial papel citoprotector frente a la acción de las

ERO. En las nefritis por formación de inmunocomplejos, se estimula a los leucocitos polimorfonucleares y a los macrófagos a producir radicales aniones superóxido. Las ERO van a jugar un importante papel en el desarrollo del daño renal y en la formación de la proteinuria. La pérdida de nefronas conduce a una mayor producción de ERO. El aumento de la peroxidación de lípidos de la membrana de los glóbulos rojos está consistentemente documentado en pacientes con IRC, lo cual es un reflejo del aumento del estrés oxidativo por las ERO. Los pacientes en hemodiálisis por IRC, tienen un aumento del estrés oxidativo, por una inadecuada eliminación de las ERO continuamente generadas. El contacto entre la membrana dializadora y los componentes séricos y los polimorfonucleares, produce una activación del complemento, producción de citokinas y de ERO. Esta situación lleva a la peroxidación lipídica, una desnaturalización de proteínas, daño de las células endoteliales, y a un continuo estrés oxidativo. En el caso de la diálisis peritoneal también encontramos un aumento del estrés oxidativo, que se pone de manifiesto por unos niveles plasmáticos disminuidos de selenio y de actividad de GHX. Pero este estrés oxidativo parece ser menos intenso que en el caso de la hemodiálisis y a su vez más que en los pacientes con IRC no incluidos en programas de diálisis. En los pacientes trasplantados de riñón también hay evidencia de aumento de oxidación de LDL. Este hecho facilita la progresión de la aterosclerosis, contribuyendo al rechazo agudo y crónico vascular del órgano transplantado. La nefrotoxicidad de algunos fármacos habitualmente utilizados, como la gentamicina, daunorubicina y la ciclosporina y la de otros compuestos como el mercurio, parece ser mediado por un aumento del estrés oxidativo. Parece ser demostrado que las profundas alteraciones en el sistema redox extracelular que ocurren en la IRC y en la hemodiálisis pueden ser una explicación adecuada para las complicaciones cardiovasculares de estos pacientes<sup>30</sup>.

### **2.5.6. Tóxicos que Alteran el Estado Redox**

El daño celular inducido por algunos tóxicos a nivel renal como el paraquat se manifiesta con un aumento de los marcadores de estrés oxidativo (estado del glutatión y aumento de MDA) y una disminución del metabolismo tubular renal (consumo de oxígeno y transporte de distintos compuestos) en relación con una alteración de la cadena de transferencia de electrones mitocondriales que produciría una reducción de las funciones metabólicas, todo ello originado por un aumento de formación de ERO. Se demuestra una inhibición de la bomba Na/K-ATPasa por la disminución de consumo de oxígeno basal; con otros tóxicos que también interfieren con el ciclo redox aumentando la producción de ERO, como el rhein (ácido 4,5-dihydroxianthraquinone-2-carboxílico), de los cuales se estudiado su hepatotoxicidad. Los hallazgos indican una alteración de la membrana mitocondrial (con disminución del potencial de membrana), una depleción de glutatión, una alteración de la homeostasis del calcio con importante elevación de los niveles intracelulares, oxidación lipídica detectada por aumento de los niveles de MDA y una depleción del ATP que pueden llevar a la muerte celular <sup>30</sup>.

### **2.5.7 Diabetes Mellitus**

Los altos niveles de glucosa característicos de la diabetes inducirían la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación no enzimática altera la estructura y la función de las proteínas. Es sabido que la autooxidación de azúcares genera ERO. A concentraciones altas de glucosa, típicas de estados diabéticos, la producción de ERO se incrementa en presencia de metales de transición. Pero el aumento de estrés oxidativo descrito en los diabéticos, no está únicamente relacionado con la aceleración en la producción de ERO, sino también por la disminución de antioxidantes. La vía del poliol es un posible mecanismo por el que la hiperglucemia puede alterar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones diabéticas. La activación de la vía del poliol disminuiría el NADPH y los niveles de glutatión, aumentando de esta manera el estrés oxidativo <sup>30</sup>.

### **2.5.8. Hipertensión Arterial (HTA)**

La HTA puede ser considerada como un conjunto de resultados sistémicos de las lesiones (vasculares, parenquimatosas, etc.) producidas por las ERO. Probablemente los antioxidantes y rastrillos de las ERO sean una nueva expectativa de tratamiento, implicando en ello acciones terapéuticas que actúen benéficamente sobre las manifestaciones presentes en la anatomía patológica (fibrosis, hipertrofia) y en la bioquímica (inhibición de la bomba  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ , inestabilidad de membranas, lesiones sobre DNA, etc.) de la HTA, moderando y/o evitando las complicaciones clínicas (síndrome X) y realizando al mismo tiempo cardioneuro-retino-protección. En la HTA se ha encontrado aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como un aumento en la cantidad total de lípidos y una disminución de la capacidad antioxidante. La HTA predispone a acelerar la aterosclerosis, al menos en parte a causa de la sinergia entre elevación de presión sanguínea y otros estímulos aterogénicos que inducen estrés oxidativo en los vasos arteriales<sup>30</sup>.

### **2.5.9 Cirrosis, Insuficiencia Hepática y Hepatopatía Alcohólica**

Tradicionalmente se consideraba que la presión portal en las enfermedades hepáticas estaba determinada solamente por la alteración de la arquitectura hepática y por el flujo sanguíneo esplácnico. Pero al ser documentada una hipertensión portal reversible en hepatitis alcohólica y en el fallo hepático agudo, era necesaria la intervención de mediadores vasoactivos para explicar el mecanismo de esta hipertensión portal aguda y también el por qué los pacientes con cirrosis desarrollaban hemorragia aguda por varices en periodos de descompensación hepática. Uno de estos mediadores puede ser el 8-iso-PGF2a, un producto de la peroxidación lipídica por las ERO, que ha demostrado elevar la presión portal en ratas cirróticas. Extrapolándolo a pacientes con cirrosis, la peroxidación lipídica secundaria al daño hepático por alcohol, sepsis u otras enfermedades hepáticas pueden producir un aumento agudo de la presión portal (a través del 8-iso-PGF2a y/u otros mediadores) tal y como se

observa en el daño hepático agudo. Esta elevación de la presión portal se pudo bloquear con SQ29548 un antagonista del receptor de tromboxanos. El daño hepático inducido por alcohol está relacionado, al menos en parte, a un estrés oxidativo causado por la producción de ERO y/o a un descenso de los antioxidantes <sup>30</sup>.

#### **2.5.10 Otros Procesos Implicados**

Reoxigenación o reperfusión, desmielinización, distrofia muscular, artritis e inflamación, enfisema pulmonar, amiloidosis, colagenosis, conectivopatías (LES, esclerodermia, enfermedad de Wegener), colitis ulcerosa, demencia senil, dermatitis de contacto, displasia broncopulmonar, enfermedad de Alzheimer, distrés respiratorio del adulto, mutaciones, lipofuscinosis, enfermedad de Parkinson, EPOC, fibroplasia retrolental, Kawshiorakor, isquemia cerebral e hística, glomerulonefritis, miocardiopatías, insuficiencia cardíaca, muerte súbita cardíaca, porfirias, úlcera péptica, Síndromes de ataxia-teleangiectasia, de Down, de Bloom, de Dubin-Johnson-Sprinz, VIH, etc <sup>30</sup>.

#### **2.5.11 Estrés Oxidativo e Hipoxia en la Altura**

La vida en las grandes alturas somete al organismo a reiteradas descompensaciones. Junto con la disminución de la temperatura y de la humedad del ambiente, la exposición a una mayor radiación UV e ionizante, el factor más agobiante lo representa el descenso de la presión barométrica y por ende, la disminución del oxígeno.

Este fenómeno se conoce como hipoxia hipobárica y cuya expresión equivale a la disminución del aporte de oxígeno en el aire inspirado, causando a su vez la caída de la presión parcial del oxígeno en arterias con una menor saturación de la hemoglobina y como consecuencia final, provocando una hipoxia tisular. Ante esto, el organismo activa una serie de mecanismos que conducen a compensar la hipoxemia (menor contenido de oxígeno en la sangre). Estos mecanismos han sido adecuadamente desarrollados en los nativos de altura. Es



así, como el hombre peruano ha vivido por generaciones en zonas alto-andinas y que en la actualidad se encuentre adaptado a la altura <sup>11</sup>.

### **2.5.12 Estrés Oxidativo Durante el Ejercicio Físico**

Aunque la actividad física se sabe que puede tener efectos beneficiosos sobre la salud, muchos estudios han divulgado que el ejercicio físico induce la tensión oxidativa, aumentando la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO). Son muchos los trabajos en los que se recoge un incremento en la producción de radicales libres durante el ejercicio. Éste se manifiesta en un daño oxidativo a distintos niveles: músculo esquelético, cardíaco, hígado y sangre.

El ejercicio aeróbico causa un aumento del consumo de oxígeno y puede dar lugar a niveles elevados de radicales libres. Se ha demostrado que el consumo de oxígeno del cuerpo aumenta de 10 a 20 veces sobre el estado de reposo durante el ejercicio aeróbico. Para reducir al mínimo el estrés oxidativo y para evitar los radicales libres el cuerpo utiliza un sistema de defensa antioxidante muy eficaz que contiene antioxidantes alimenticios como los tocoferoles, ácido ascórbico o polifenoles y enzimas antioxidantes endógenas como la catalasa o glutatión peroxidasa. Si la formación de radicales libres excede la capacidad antioxidante, los lípidos, proteínas y otros componentes de la célula pueden ser oxidados.

Los radicales libres afectan también al ADN, El ejercicio físico agudo aumenta el daño al ADN, tal como se evidencia por el aumento de 8-oxo-dG. Sin embargo, en seres humanos, el entrenamiento previene dicho aumento. La fuerte correlación negativa entre la concentración plasmática de TBARS y el VO<sub>2</sub> máx. sugiere que una buena aptitud física puede tener un papel protector contra el estrés oxidativo <sup>31</sup>.

## **2.6 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

Ya que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, la evolución ha ido dotando a estos organismos de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como antioxidante a “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato”<sup>18</sup>.

De modo que pueden actuar de las siguientes formas:

- Previendo la formación de ERO
- Interceptando el ataque de ERO
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ERO
- Facilitando la reparación del daño causado por ERO y, por último
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

La función de un antioxidante, es actuar como un donador de electrones, capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción o sacrificar su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas, ADN, etc. funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor de estos últimos o simplemente son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones<sup>28</sup>.

### **2.6.1 Red Antioxidante**

Para proveer el máximo de protección, los antioxidantes plasmáticos e intracelulares, están armónicamente integrados para lograr la máxima supresión de las reacciones que

generan los radicales libres. Estos últimos, se distribuyen preferentemente en los organelos que, por la intensidad de su actividad y su función metabólica, generan una mayor producción de radicales libres, localizados tanto en membranas, como en el citosol celular. Existe consenso de que la defensa antioxidante en los organismos aerobios, involucra antioxidantes con función:

- **Preventiva:** Diversas proteínas con núcleos enlazados o coordinados a metales como cobre (albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina) y/o hierro (ferritina, transferrina y mioglobina), previenen la formación de ERO por encima de los niveles normales del organismo.
- **Reparadora:** Enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que han sido dañadas por el ataque de radicales libres, tales como superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GPx), Glutación reductasa y Catalasa.
- **Secuestradora:** Cuya acción es secuestrar y limitar la exposición a los iones  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ , ya que su exceso promueve la generación de radicales libres. Las proteínas que cumplen esta función son: Ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosina. Otros, como Tocoferol, Betacaroteno, Acido ascórbico y Flavonoides.

Un componente adicional en la red antioxidante, son las proteínas de almacén y transporte de iones metálicos <sup>28</sup>.

**Tabla 3. Sistema de Defensa *in vivo* Contra el Daño Oxidativo (Noguchi y Niki 1999) <sup>33</sup>.**

<b>1. Antioxidantes preventivos. Supresión de la formación de radicales libres</b>	
<b>a) Descomposición de hidroperóxidos y peróxidos de hidrogeno</b>	
Catalasa	Descomposición de peróxido de hidrogeno $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Glutación peroxidasa (celular)	Descomposición de peróxido de hidrogeno e hidroperóxidos de ácidos grasos libres $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{LOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Glutación peroxidasa (plasma)	Descomposición de peróxido de hidrogeno y fosfolípidos Hidroperoxidados $\text{PLOOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{PLOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$
Peroxidasa	Descomposición del peróxido de hidrogeno y lípidos hidroperoxidados $\text{LOOH} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{LOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{A}^{\cdot 2}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$
Glutación tio-transferasa	Descomposición de lípidos hidroperoxidados
<b>b) Secuestro de metales por quelación</b>	
Transferrina, lactoferrina	Secuestro de hierro (fierro)
Haptoglobina	Secuestro de hemoglobina
Hemopexina	Estabilización del grupo hemo
Ceruloplasmina, albumina	Secuestro de cobre
<b>c) Amortiguamiento de especies reactivas de oxígeno</b>	
Superóxido dismutasa (SOD)	Desproporción molecular de superóxido $2\text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Carotenoides, vitamina E	Amortiguamiento de oxígeno singlete
<b>2. Antioxidantes de rescate de radical: radicales que actúan por inhibición del inicio y rompimiento de la cadena de propagación</b>	
Hidrofílicos	Vitamina C, ácido úrico, bilirrubina, albumina
Lipofílicos	Vitamina E, ubiquinol, carotenoides, flavonoides
<b>3. Enzimas de reparación: reparación del daño y reconstitución de membranas</b>	
Lipasas, proteasas, enzimas reparadoras de ADN, transferasas	
<b>4. Adaptación: generación de las enzimas antioxidantes y las transfieren al sitio adecuado en el momento indicado a la concentración necesaria.</b>	

### 2.6.2 Clasificación de los Antioxidantes

Los antioxidantes naturales han sido clasificados de diferentes maneras. Venereo en el 2002 los clasificó según su sitio de acción.

**Tabla 4. Clasificación de los Antioxidantes Según el Sitio Donde Ejercen su Acción <sup>28</sup>.**

INTRACELULAR	MEMBRANA	EXTRACELULAR
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafanasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Otra de las clasificaciones citadas por Reylli *et al.* (1990), es según su origen.

**Tabla 5. Clasificación de los Antioxidantes, Según su Origen <sup>28</sup>.**

ORIGEN	ACCIÓN
<b>1. Exógenos</b>	
Vitamina E	Neutraliza al oxígeno singlete. Captura radicales libres de hidroxilo. Captura O <sub>2</sub> . Neutraliza peróxidos.
Vitamina C	Neutraliza al oxígeno singlete. Captura radicales libres de hidroxilo. Captura O <sub>2</sub> . Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Betacarotenos, flavonoides y licopenos	Neutralizan al oxígeno singlete.
<b>2. Endógenos</b>	
Enzimáticos	Cofactor.
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, sodio, magnesio.
Catalasa (CAT)	Hierro.
Glutation Peroxidasa (GPx)	Selenio.
<b>3. No enzimáticos</b>	
Glutation, Coenzima Q	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.
Ácido tiotico	Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina).

Las clasificaciones más utilizadas, establecen las diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica, dividiéndolos en naturales enzimáticos y no enzimáticos <sup>18, 28, 32</sup>.

#### **2.6.2.1 Antioxidantes Enzimáticos**

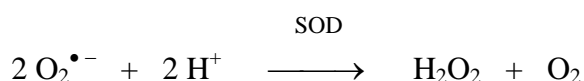
Los antioxidantes enzimáticos o endógenos son la primera línea defensiva antioxidante que actúa contra el daño oxidativo por medio de la interacción de las ERO; actúan como

catalizadores y para ejercer su desempeño no son necesarias grandes cantidades, además de ser reciclados con gran eficiencia luego de haber desempeñado su función <sup>33</sup>.

El grupo de antioxidantes enzimáticos catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Posteriormente, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos y lo hacen a expensas del NADPH producido en las diferentes vías metabólicas. Frente a una situación de exposición prolongada a ERO, puede ocurrir una disminución en las concentraciones del NADPH, necesario en otros importantes procesos fisiológicos, a pesar de que algunos antioxidantes enzimáticos no consumen cofactores <sup>28</sup>.

#### **2.6.2.1.1 Superóxido Dismutasa (SOD) (Superóxido Oxidorreductasa, E.C. 1.15.1.1.)**

Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas. Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969. La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa.



Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, está alrededor de  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). La catálisis de la reacción de dismutación llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa incrementa esta velocidad en el orden de 10.000 veces. Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas, según el grupo prostético metálico ligado al enzima <sup>18</sup>.

**Tabla 6. Tipos de SOD y Localización Celular Mayoritaria <sup>18</sup>.**

ENZIMA	GRUPO PROSTÉTICO	LOCALIZACIÓN CELULAR
Cu,Zn-SOD	Cu, Zn	Citosol y Núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial y Citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

#### **2.6.2.1.1.1 Superóxido Dismutasa Dependiente de Cobre y Zinc (Cu, Zn-SOD)**

La superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu, Zn-SOD) aparece en la mayoría de las células eucariotas. Es una proteína soluble que contiene como cofactores iones de cobre y de zinc. Existe en muchas formas isoméricas que se distinguen por el contenido en iones metálicos. La más abundante de las formas isoméricas se localiza mayoritariamente en el citosol, y en menor cantidad en el núcleo (ver Tabla 6) aunque también tiene otras localizaciones. Su transcripción se lleva a cabo a partir del ADN nuclear. A escala tisular, esta isoforma se encuentra a elevadas concentraciones en hígado, cerebro y testículos, y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas. Extracelularmente aparece una isoforma caracterizada por su gran peso molecular. Aunque esta isoforma es detectable en plasma, se localiza principalmente en la matriz extracelular, probablemente para interceptar el daño causado por el superóxido que liberan neutrófilos y macrófagos al ejercer su función <sup>18</sup>.

#### **2.6.2.1.1.2 Superóxido Dismutasa Dependiente de Manganeseo (Mn-SOD)**

Hay dos tipos de superóxido dismutasas que contienen manganeseo. Una de ellas se encuentra mayoritariamente en la matriz mitocondrial y en menor medida en el citosol. Su transcripción tiene lugar a partir del ADN mitocondrial, y su presencia en la mitocondria es de gran importancia puesto que como se ha señalado con anterioridad, la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en las células, de modo que constituye una de las barreras frente al daño oxidativo originado por los radicales

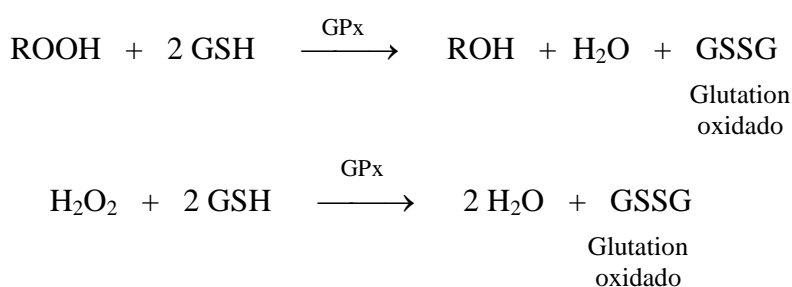
libres. La otra SOD dependiente de manganeso, se encuentra en bacterias tales como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* <sup>18</sup>.

#### 2.6.2.1.1.3 Superóxido Dismutasas Dependientes de Otros Metales

Otras enzimas superóxido dismutasa contienen hierro, como la que se halla en *Escherichia coli*. Más recientemente, se han descubierto algunas superóxido dismutasas denominadas atípicas que contienen como cofactores en su grupo prostético diferentes combinaciones de los metales mencionados anteriormente u otros metales <sup>18</sup>.

#### 2.6.2.1.2 Glutación Peroxidasa (GPx) (E.C. 1.11.1.9.)

La glutatión peroxidasa (GPx) es también un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas.



La enzima GPx es una selenoproteína, es decir, es una enzima selenio (Se) dependiente que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol de los eritrocitos, lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune; cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor el glutatión reducido (GSH), los productos de la reacción, son el glutatión oxidado (GSSG) y el agua <sup>18</sup>.

Esta enzima se ha encontrado en tejido testicular y en espermatozoides de mamíferos y como una enzima que realiza un papel estructural en la cápsula mitocondrial en la parte media y en el flagelo de los espermatozoides, cumpliendo de esta manera una función metabólica importante como antioxidante.



Al igual que otras selenoproteínas, el sitio activo de GPx contiene Selenio bajo la forma de residuos de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica conformada por 21 aminoácidos.

Existen 3 formas de GPx que difieren tanto en su ubicación como en la especificidad de sustrato:

- **GPx-c clásica o forma celular:** tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por el lipoperóxido, está prácticamente en todas las células, puede reducir el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos libres y convertirlos en agua y alcoholes.
- **GPx -p plasmática o forma extracelular:** presenta afinidad semejante para ambos sustratos es una glicoproteína purificada, caracterizada a partir de plasma humano que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón.
- **GPx-PH fosfolípido hidroperóxido:** tiene afinidad específica para los lipoperóxidos, cuya función biológica primaria es proteger contra la lipoperoxidación, reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Es la única isoforma cuya estructura es monomérica; es decir, contiene un solo residuo de selenocisteína.

Una cuarta forma de la GPx, es la gastrointestinal y representa la principal peroxidasa dependiente de glutatión en el tracto gastrointestinal.

Es importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol y en la protección contra la toxicidad por ingestión de hidroperóxidos lipídicos. Las formas GPx-c y GPx-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos.

La GPx, actúa junto con el superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) y la catalasa (CAT) para catalizar la degradación intracelular de hidroperóxidos lipídicos, evitando de esta forma posibles daños oxidativos a las proteínas y a las membranas de los organelos, pudiendo llegar a causar alteraciones al ADN en los espermatozoides <sup>28</sup>.

### 2.6.2.1.3 Catalasa (CAT).- (Peróxido de Hidrógeno Oxidorreductasa, E.C. 1.11.1.6.)

La catalasa es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo, de amplia distribución intracelular, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas, citosol, etc.

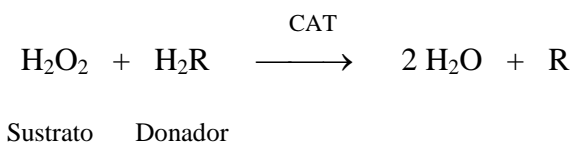
En general las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasas, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa.

Esta enzima, presenta 2 funciones fundamentales; la primera es catalítica, ya que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno —proveniente de la dismutación del superóxido— en agua y oxígeno. Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores; la segunda función, es peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante catalasa/superoxido dismutasa (CAT/SOD) que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno <sup>28</sup>.

La catalasa participa en la eliminación de peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y una molécula de oxígeno.

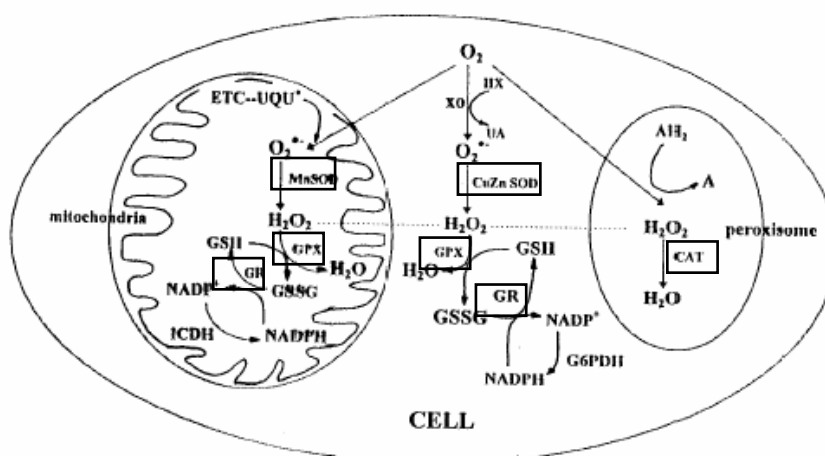


También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos.



La catalasa se halla principalmente en los peroxisomas (Tolbert and Essner, 1981), si bien en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y citosol <sup>18</sup>.

**Figura 1. Sistemas Antioxidantes Celulares<sup>18</sup>.**



#### 2.6.2.1.4 Glutatión S-Transferasa (GST)

Se señala dos isoformas de GST, citosólicas y microsomales. Su función primaria es catalizar la conjugación de glutatión reducido (GSH) con una gran cantidad de compuestos orgánicos. Las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente de selenio; también puede detoxificar al 4-hidroxinonanal un producto de la peroxidación de lípidos<sup>28</sup>.

#### 2.6.2.1.5 Tiorredoxina Reductasa (TrxR)

Ésta enzima es una selenoproteína que contiene en su penúltimo carbono un residuo de selenocisteína, necesario para su actividad catalítica. Existen dos isoformas: la TrxR1 citosólica y la TrxR2 mitocondrial. Las dos isoformas cuentan con un FAD por subunidad, el cual reduce el grupo disulfuro del sitio activo, su función es catalizar la reducción del polipéptido tiorredoxina<sup>28</sup>.

#### 2.6.2.1.6 Peroxirredoxinas (Prxs)

Estas enzimas se caracterizan por poseer residuos de cisteína en su centro catalítico, lo cual las identifica como enzimas antioxidantes específicas para el grupo tiol. Los grupos cisteínas son oxidados a ácido sulfénico en forma reversible por los sustratos de estas enzimas

(peróxidos). Están subdivididas en tres subclases: Prx 2-cisteína típica (Prx I-IV) se localiza en mitocondrias, Prx 2-cisteína atípica núcleo y citoplasma (Prx V) y Prx 1-cisteína citoplasma (Prx VI). Están envueltas en degradación enzimáticas de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos y peroxinitros, por lo tanto, las Prxs asumen un papel importante contra el estrés oxidativo. La tioredoxina puede regenerar la forma reducida de las Prx <sup>28</sup>.

#### **2.6.2.1.7 Hemo Oxigenasa (HO)**

Esta enzima está presente en dos isoformas: una constitutiva ( $\text{HO}^{-2}$ ) y una inducible ( $\text{HO}^{-1}$ ). Se localiza en el retículo endoplásmico. La HO cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo proveniente de las hemoproteínas, produciendo biliverdina, monóxido de carbono y hierro. La biliverdina es reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa <sup>28</sup>.

La expresión de  $\text{HO}^{-1}$  aumenta en respuesta a muchos agentes que inducen estrés oxidativo como lo es el mismo grupo hemo. La actividad antioxidante de la  $\text{HO}^{-1}$  se puede explicar, al menos en parte, por el hecho de que esta enzima degrada a un prooxidante (grupo hemo) y genera un compuesto con actividad antioxidante (biliverdina) el cual es transformado a otro antioxidante (bilirrubina) <sup>28</sup>.

#### **2.6.2.2 Antioxidantes no Enzimáticos**

Los antioxidantes no enzimáticos, constituyen un heterogéneo grupo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. En esencia, el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Los antioxidantes no enzimáticos hidrofílicos, se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares; éstos incluyen vitamina C, glutatión, ácido úrico, ergotioneína y flavonoides polifenólicos <sup>28, 34</sup>.

### 2.6.2.2.1 El Glutati3n

Es el tiol no proteico m3s abundante en las c3lulas de mam3feros. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y est3 constituido por 3 amino3cidos: 3cido glut3mico, ciste3na y glicina. Su estructura le confiere ciertas caracter3sticas que hacen que el glutati3n tenga una funcionalidad amplia e importante en la c3lula.

Se puede encontrar en 2 formas seg3n su estado de 3xido-reducci3n: como GSH o glutati3n reducido, o como GSSG o glutati3n oxidado que est3 compuesto por 2 mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las ciste3nas.

El GSH participa en gran cantidad de procesos fisiol3gicos:

- Papel en la s3ntesis del ADN. En este proceso se requiere la reducci3n de ribonucle3tidos para formar deoxirribonucle3tidos, reacci3n catalizada por la ribonucle3tido reductasa. En esta reacci3n debe intervenir un donante de hidr3geno que puede ser la tioredoxina, o la glutarredoxina dependiente de GSH.
- Papel protector frente al estr3s oxidativo. Dado que el GSH es uno de los antioxidantes principales de la c3lula, constituye una importante barrera de protecci3n frente al estr3s oxidativo. El GSH protege a la membrana celular contra el da3o oxidativo ya que mantiene el estatus ti3lico de la misma. El GSH puede excretarse tambi3n de las c3lulas y actuar como mecanismo de emergencia frente al da3o que un exceso de GSSG puede causar, puesto que el GSSG reacciona con los grupos tioles de prote3nas formando disulfuros mixtos.
- Papel en la regulaci3n de la s3ntesis de prote3nas. Cuando el GSH se oxida los procesos de iniciaci3n y elongaci3n de la traducci3n se inhiben. Cuando el GSSG se reduce la elongaci3n se reanuda y parece que es un aumento en la concentraci3n de GSSG lo que hace que la s3ntesis proteica se inhiba.
- Colabora en la detoxificaci3n de xenobi3ticos.
- Contribuye a la captaci3n de amino3cidos en algunos tejidos.
- Constituye un reservorio de ciste3na.

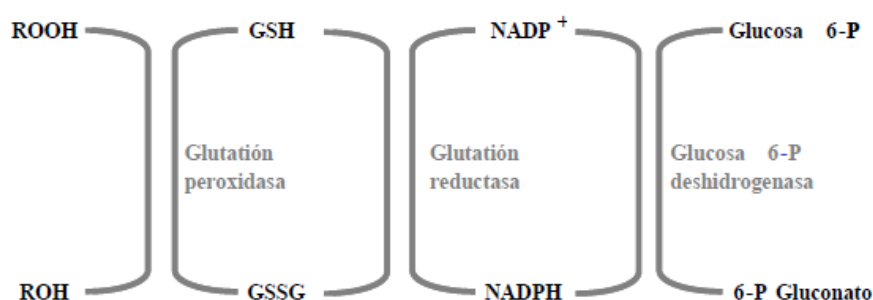
- Modula actividades enzimáticas.
- Juega un papel en la homeostasis del calcio.
- Participa en la regulación de la proliferación celular <sup>18</sup>.

#### 2.6.2.2.1.1 Papel Antioxidante del Glutathión: Ciclo Redox

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa.

Cuando se da una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado es inmediatamente reducido a GSH por medio del enzima glutatión reductasa. La glutatión reductasa requiere NADPH como cofactor, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. Tanto la glutatión peroxidasa como la glutatión reductasa se hallan predominantemente en el citosol, existiendo también cierta actividad en la mitocondria <sup>18</sup>.

**Figura 2. Ciclo redox del glutathión <sup>18</sup>.**



#### 2.6.2.2.2 Vitamina A

Es un término genérico que abarca a los compuestos de origen animal que presentan actividad biológica de vitamina A. En los vegetales, existe como provitamina llamada B-caroteno. Por su conformación estructural son excelentes capturadores de radicales libres. Protegen contra la lipoperoxidación, sobre todo, la inducida por el sistema de la xantina

oxidasa, y elimina el ion superóxido y radicales peroxilos. Al igual que la vitamina C, puede comportarse como prooxidante, pueden inducir estrés oxidativo incrementando la producción de radicales libres, aparentemente en condiciones de altas presiones parciales de oxígeno. Estas acciones dependen también de la presencia de otros carotenoides y de la interacción con antioxidantes como la vitamina E<sup>28</sup>.

#### **2.6.2.2.3 Vitamina C**

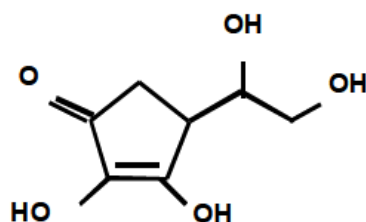
Se considera uno de los más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales. Es soluble en agua y se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos, el plasma contiene alrededor de 60  $\mu\text{mol/L}$ . Las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, pero los humanos, otros primates superiores y los cobayas no poseen uno de los enzimas imprescindibles para su síntesis, teniendo que ser incorporada con la dieta.

Cuando reacciona con las ERO se oxida a dihidroascorbato que será reciclado a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa. Por ello, el dihidroascorbato se encuentra en concentraciones mucho más bajas que el ascorbato.

Esta vitamina es efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. En solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana.

La vitamina C es una molécula que posee tanto propiedades antioxidantes como prooxidantes, dependiendo de la concentración de hierro tisular, aunque no ha podido demostrarse su efecto prooxidante *in vivo*. Cuando la cantidad es baja, ejerce un efecto antioxidante, uniéndose al radical superóxido o hidroxilo y formando radical semihidroascorbato, que posteriormente es reducido por el glutatión. Sin embargo, en condiciones de alta concentración tisular de hierro, el ácido ascórbico es capaz de catalizar la reacción de Fenton y por lo tanto, generar ion ferroso, que a su vez facilita la producción de radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss<sup>18</sup>.

**Figura 3. Estructura de la Vitamina C.**

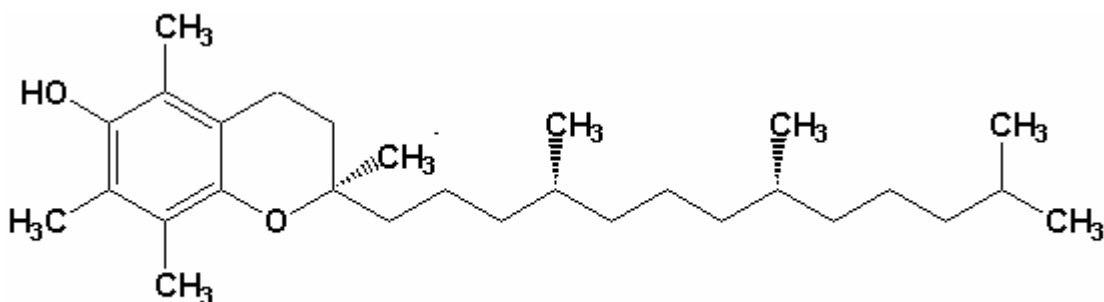


#### 2.6.2.2.4 Vitamina E

El nombre genérico de esta vitamina, hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es una vitamina liposoluble, principal antioxidante en las membranas celulares y en las LDL, junto al  $\gamma$ -tocoferol, se le considera esencial en la defensa celular. Unida a la porción hidrofóbica del alfa-tocoferol existe un grupo OH, cuyo H puede removerse fácilmente y funcionar como donador de electrones.

Es probablemente el antioxidante más potente del organismo, en cuanto a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación.

**Figura 4. Estructura de la Vitamina E.**



La captura de radicales libres superóxido, hidroxilo y peroxilos lipídicos, la desarrolla en membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y detiene la propagación de la lipoperoxidación. Los radicales peroxilos generados durante la peroxidación lipídica extraen el H de la molécula del tocoferol. El radical tocoferol resultante es poco reactivo por lo que detiene la reacción en cadena. El radical tocoferol migra hacia la superficie de la membrana y se convierte en el radical libre tocoferoxilo; se regenera en alfa



tocoferol a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A. La vitamina E, además, protege la oxidación de los lípidos, también ayuda a daños en el ADN y reduce el nivel de mutación cromosómica en las células espermáticas.

La absorción de la vitamina E dietaria, ocurre vía los quilomicrones en el yeyuno (15-45 %) y posteriormente pasa a la vía del sistema linfático. Los tocoferoles son transportados como parte del complejo de las lipoproteínas. Su absorción requiere de sales biliares y jugos pancreáticos cuya secreción es estimulada por la grasa dietaria.

La dieta humana está compuesta por multitud de alimentos que contienen vitamina E. Las fuentes ricas de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, de soja y de semilla de algodón), y productos hechos a partir de estos aceites como la margarina o la mayonesa. Contribuyen considerablemente a los suplementos en vitamina E el germen de trigo, las nueces y algunos vegetales de hojas verdes <sup>18</sup>.

#### **2.6.2.2.5 Ubiquinona (Coenzima Q)**

Es un derivado de la quinona. Su estructura es semejante al tocoferol y se le ha identificado como un portador adicional en la cadena respiratoria. Aproximadamente 50 % de la ubiquinona celular se encuentra en la mitocondria. Aunque su función antioxidante in vivo está en discusión, su forma reducida, el ubiquinol, tiene una fuerte actividad antioxidante, comparado con su forma oxidada, llegando a consumirse antes que la vitamina E, frente a una situación de exposición a radicales libres. El ubiquinol, impide que las ERO desencadenen la lipoperoxidación, también participa en el reciclaje de la vitamina E en el ámbito mitocondrial <sup>28</sup>.

#### **2.6.2.2.6 Ácido Úrico**

Aunque tradicionalmente ha sido considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, su función como antioxidante, tanto intracelular como extracelular, ha

comenzado a reconocerse. Su mecanismo de acción aparentemente es prevenir la oxidación de la Vitamina C y formar complejos con los metales Fe y Cu <sup>28</sup>.

#### **2.6.2.2.7 Ergotioneína**

Este aminoácido, llega a las células de los mamíferos a través de la ingesta de vegetales. Es un poderoso capturador de ERO producido por la acción de la mieloperoxidasa presente en neutrófilos. Puede reaccionar con peroxinitritos y sus derivados y capturar iones hidroxilos. Sus estados oxidados intermedios son rápidamente regenerados en presencia de ascorbato <sup>28</sup>.

#### **2.6.2.2.8 Ceruloplasmina**

Proteína circulante portadora de cobre; oxida al ión  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  por lo que inhibe el proceso lipoperoxidativo y la reacción de Fenton dependiente de  $\text{Fe}^{2+}$  <sup>34</sup>.

#### **2.6.2.2.9 Transferrina**

Son proteínas circulantes transportadoras de hierro. Se encargan de enlazar al hierro deteniendo o retardando su participación en la reacción de Haber–Weiss y en la peroxidación lipídica <sup>35</sup>.

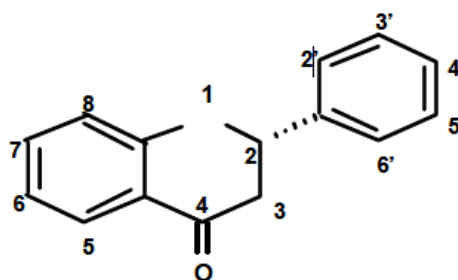
#### **2.6.2.2.10 Compuestos Polifenólicos**

Estos compuestos se encuentran en pequeñas cantidades en frutas, vegetales y granos, tienen actividad biológica entre la que destaca su actividad antioxidante, antiinflamatoria, como antiagregantes plaquetarios, antimicrobiana y antitumoral. Los principales son ácidos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas, flavonoides, flavonas, isoflavonas, flavonoles, derivados de la cumarina, derivados de fitoalexane, ácido cinámico y antocianidinas.

Son liposolubles o hidrosolubles y se localizan tanto intracelular como extracelularmente. Los antioxidantes no enzimáticos de naturaleza hidrófoba se ubican en

membranas y, generalmente, bloquean la formación de hidroperóxidos, o interrumpen la propagación de la lipoperoxidación, otras de sus funciones son: actuar como capturadores de radicales libres, agentes reductores, formación de complejos con metales prooxidantes o extinguidores de la formación de oxígeno solo. La mezcla de estos compuestos puede actuar en forma sinérgica con las vitaminas funcionando como protectores y regeneradores de los antioxidantes <sup>28</sup>.

**Figura 5. Estructura Básica de los Flavonoides <sup>18</sup>.**



Otros compuestos sugeridos con actividad antioxidante son la albúmina, el ácido lipoico, el fibrinógeno, la bilirrubina y la glucosa <sup>18</sup>.

#### **2.6.2.2.11 Función de los Metales en la Defensa Antioxidante**

Una atención especial merecen algunos minerales traza ligados a la protección contra el daño oxidativo, tales como Zn, Se, Mn, Fe y Cu. Aunque su mecanismo general de acción es a través de la participación en sistemas enzimáticos, ya sea como componentes estructurales o activadores, también son capaces de ejercer funciones antioxidantes en forma independiente <sup>28</sup>.

##### **2.6.2.2.11.1 Zinc**

El zinc (Zn) puede ejercer sus efectos en forma mediata o inmediata. La primera requiere de una prolongada exposición al Zn, lo que desencadena la inducción de metalotioneínas, las cuales, en último término, cumplen la acción antioxidante. La mecánica del efecto inmediato se desarrolla a través de dos vías: reduciendo la formación de radicales

hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno mediante la competencia con los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+}$  que participan en la reacción de Fenton; o bien, disminuyendo la susceptibilidad de los grupos sulfidrilos de las proteínas a la oxidación. Se ha informado, además, que la actividad antioxidante del Zn influye en la estabilización no enzimática de membranas<sup>28</sup>.

#### **2.6.2.2.11.2 Selenio**

El selenio (Se) se establece como un elemento traza esencial y como un tóxico natural para la salud animal. La función que desempeña en el organismo es bajo la forma de selenoenzimas. La deficiencia de Se es traducida en la disminución de la actividad de GSH-Px y otras selenoenzimas, dejando a la célula expuesta al ataque oxidativo de las ERO. Se han caracterizado 11 selenoproteínas<sup>28</sup>.

#### **2.6.2.2.11.3 Magnesio**

Estudios recientes, realizados en ratas, señalan que el magnesio (Mg) manifiesta propiedades protectoras contra la lipoperoxidación en algunos tejidos; aunque los mecanismos involucrados no son del todo claros, se presume que el Mg puede incrementar la actividad de SOD, actuar como un capturador de radicales hidroxilo y superóxido, actuar como promotor de la síntesis de metalotioneínas e interferir por competencia con los iones  $\text{Fe}^{28}$ .

#### **2.6.2.2.11.4 Fierro y Cobre**

Si bien los metales de transición  $\text{Fe}^{+2/+3}$  y  $\text{Cu}^{+/+2}$  desarrollan importantes funciones antioxidantes, como constituyentes de enzimas y proteínas, también pueden actuar como poderosos generadores de radicales libres cuando estos iones se encuentran libres en altas concentraciones. La forma reducida de estos iones,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+}$ , es mucho más reactiva que su forma oxidada,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ . Los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Cu}^{+}$  promueven la descomposición del peróxido de hidrógeno cuyo producto final más importante es el radical hidroxilo.

Esta es una de las principales vías de producción del radical hidroxilo en el medio celular y se conoce como reacción de Fenton. Por otra parte, la autooxidación de estos iones puede llevar a la formación de radicales superóxido que facilitan la transferencia de electrones a macromoléculas biológicas tales como lípidos, proteínas y ADN. Se confirma, así, la importancia de las proteínas séricas encargadas de transportar y quelar estos metales <sup>18,28</sup>.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

El estudio se realizó en 48 sujetos voluntarios, aparentemente sanos repartidos en dos grupos experimentales: 24 sujetos residentes en Nueva Cajamarca (Región San Martín) y 24 sujetos residentes de Lima, cuyas edades están comprendidas entre 20 y 30 años. Los sujetos dieron su consentimiento escrito para participar de acuerdo con la Declaración Helsinki de 1975.

#### **3.1 EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

Las muestras de sangre fueron extraídas de la vena media cubital del antebrazo con el sistema vacutainer, utilizando como anticoagulante heparina sódica. Se tomó 5mL de sangre de cada sujeto en estado de ayuno.

Se separó 1 mL de la muestra para las determinaciones de Hematocrito y Hemoglobina. Lo restante se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos para la obtención del paquete eritrocitario. Luego se procedió a lavarlos tres veces con cloruro de sodio al 0.9 % que serían utilizados en las determinaciones de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) y el malondialdehído (MDA). Las muestras de sangre fueron conservadas en cadena de frío hasta la realización del análisis. El hematocrito fue medido el día de la toma de muestra.

##### **3.1.1 Equipos y Materiales**

###### **3.1.1.1 Equipo de Laboratorio**

- Espectrofotómetro Hewlett Packard UV/Vis
- Centrífuga IES
- Balanza Analítica (sensibilidad 0.0001 g)
- Cocinilla eléctrica
- Baño María

### **3.1.1.2 Material de Laboratorio**

- Pipeta Sahli
- Tubos de ensayo 10 x 75 mm
- Pipetas volumétricas y graduadas
- Micropipetas
- Termómetro
- Cronómetro
- Matraces aforados
- Beakers
- Gradillas

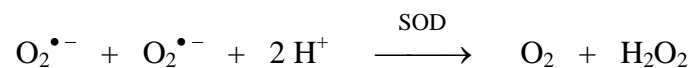
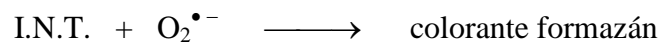
## **3.2 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)**

### **3.2.1 Método**

Basado en el trabajo de Joe M. Mc Cord e Irwin Fridovich. Se utilizó el kit de análisis RANSOD para determinación cuantitativa in vitro de SOD.

Se fundamenta en que la superóxido dismutasa (SOD) acelera la dismutación del radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

Este método emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la SOD por el grado de inhibición de esta reacción.



### 3.2.2 Reactivos

- Sustrato mixto (Xantina 0.05 mmol/L + I.N.T. 0.025 mmol/L)
- Solución diluyente Buffer Fosfato 0,01 mol pH 7,0
- Solución Estándar (Patrón)
- Xantina Oxidasa (80 U/L)

### 3.2.3 Procedimiento

Se tomó 10 µL de eritrocitos lavados y se hemolizaron con 1 mL de agua bidestilada fría. Luego se tomó 0,1 mL del lisado y se diluyó con 2 mL de 0,01 mol/L buffer fosfato pH 7,0.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes

- Longitud de onda: 505 nm
- Cubeta: 1 cm de espesor
- Temperatura: 37 °C

Usando una micropipeta se añadió a la cubeta:



	<b>Blanco</b>	<b>Estándar</b>	<b>Muestra</b>
<b>Muestra*</b>	-	-	0,05 mL
<b>Estándar</b>	-	0,05 mL	-
<b>Diluyente</b>	0,05 mL	-	-
<b>Sustrato</b>	0,40 mL	0,40 mL	0,40 mL
Mezclar bien			
<b>Xantina Oxidasa</b>	0,06 mL	0,06 mL	0,06 mL

**(\*) Hemolizado**

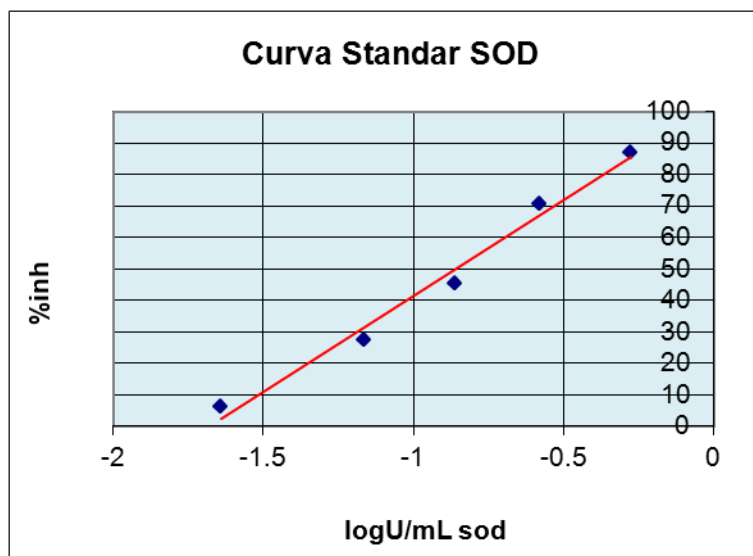
Se mezcló y leyó la absorbancia al cabo de 30 segundos y se empezó a cronometrar el tiempo simultáneamente. Se leyó las absorbancias cada 30 segundos hasta cumplir los 3 minutos.

### 3.2.3.1 Curva Patrón

Se diluyó un vial de estándar patrón (S6) con 10mL de agua bidestilada. Las diluciones subsecuentes de este estándar se prepararon con la solución diluyente para producir una curva normal.

<b>Estándar</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen de Soluciones Patrón</b>	<b>Volumen de Solución Diluyente</b>
S <sub>6</sub>	0,530 U/mL	Patrón neto	-
S <sub>5</sub>	0,265 U/mL	5 mL de S6	5 mL
S <sub>4</sub>	0,1325 U/mL	5 mL de S5	5 mL
S <sub>3</sub>	0,06625 U/mL	5 mL de S4	5 mL
S <sub>2</sub>	0,02208 U/mL	3 mL de S3	6 mL
S <sub>1</sub>	0	-	5 mL

La curva se obtuvo por regresión lineal relacionando la concentración de la actividad de SOD (U/mL) y porcentaje de inhibición (% Inh.). Con el fin de obtener una función lineal se trabajó con log U SOD/mL.



### 3.2.4 Cálculos

#### 3.2.4.1 Índice de Muestra ( $\Delta$ Abs/min)

$$\Delta \text{ Abs/min de estándar o de muestra} = \frac{\text{Abs final} - \text{Abs inicial}}{3}$$

Índice de muestra diluyente (Índice S1) = Índice de reacción sin inhibir = 100 %

#### 3.2.4.2 Porcentaje de Inhibición (% Inh.)

Todos los índices ( $\Delta$  Abs/min), tanto de los patrones como de las muestras diluidas, deben ser convertidos en porcentaje del índice del blanco (reacción sin inhibir) y restados del 100 % para obtener el porcentaje de inhibición.

Porcentaje de inhibición estándar o muestra:

$$100 - \frac{(\Delta \text{ Abs estándar o muestra/min} \times 100)}{\Delta \text{ Abs S1/min}}$$

Se representa el porcentaje de inhibición para cada patrón frente a  $\log_{10}$  (concentración del estándar en unidades SOD / mL).

Se utiliza el porcentaje de inhibición de la muestra en la ecuación de la recta, de la cual se obtiene las unidades de SOD de la curva patrón.

#### **3.2.4.3 Conversión a unidades de SOD / g de Hemoglobina**

$$\frac{\text{U SOD / mL}}{\text{g Hb / mL}} = \text{U SOD / g Hb}$$

### **3.3 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ENZIMA CATALASA (CAT)**

#### **3.3.1 Método**

Basado en el estudio de Hugo Aebi (*Catalase in vitro*, 1984).

Se fundamenta en que el peróxido de hidrógeno, en el rango ultravioleta, muestra un continuo incremento de absorción al disminuir la longitud de onda. La descomposición del peróxido de hidrógeno puede ser seguida directamente por la disminución en la absorbancia a 240 nm. La diferencia en absorbancia por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa<sup>36</sup>.

#### **3.3.2 Reactivos**

- Buffer Fosfato 50 mM pH 7,0
- Solución de Peróxido de Hidrógeno 30 mM. Se diluye 0,34 mL de peróxido de hidrógeno al 30 % con buffer fosfato para 100 mL

#### **3.3.3 Procedimiento**

Se tomó 10 µL de eritrocitos lavados, que se hemolizaron con 2 mL de agua destilada. Luego se tomó 50 µL del lisado para el análisis (\*).

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Longitud de onda: 240 nm
- Cubeta: 1 cm de espesor
- Temperatura: Ambiente (25 °C)

	Blanco	Muestra
Muestra diluida*	-	0,05 mL
Agua bidestilada	0,05 mL	-
Solución de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3 mL	3 mL

### 3.3.4 Cálculos

$$K_{\text{CAT/g Hb}} = \frac{2,3}{\Delta t} \times \frac{V_T}{V_R} \times \frac{1}{\text{Hb/L}} \times \log \left( \frac{A_1}{A_2} \right) \times 1000$$

Dónde:

$K_{\text{CAT/g Hb}}$  : Actividad de la enzima CAT expresada por gramo de hemoglobina

$\Delta t$  : Variación de tiempo

$\text{g Hb/L}$  : gramos de hemoglobina por litro

$V_T$  : Volumen total

$V_R$  : Volumen del hemolizado (volumen real)

$A_1$  : Absorbancia a 240 nm en tiempo 0

$A_2$  : Absorbancia a 240 nm en tiempo 15 seg.

## 3.4 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)

### 3.4.1 Método

La determinación de MDA se basa en la medición espectrofotométrica de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBA), con modificaciones descritas en el trabajo de Hong,

Yeh, Chang y Hu <sup>50</sup>: se adiciona NaOH para separar el MDA unido a las proteínas, las cuales son precipitadas añadiendo el reactivo ácido tricloroacético (TCA). Las sustancias reactantes con el (TBA) reaccionan formando un compuesto coloreado, dichas sustancias fueron calculadas usando el coeficiente de extinción molar  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

El TBA reacciona con facilidad con peróxidos de ácidos grasos, por esta razón se adicionó el reactivo Butil hidroxi tolueno (BHT) para prevenir la autooxidación de ácidos grasos no saturados.

El MDA es una sustancia volátil de bajo peso molecular, por lo cual se realizó el calentamiento en viales con tapa.

### **3.4.2 Reactivos**

- Hidróxido de sodio 12,5 N
- Butil hidroxi tolueno (BHT) 0,2 %
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) 18 %
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6 %

### **3.4.3 Procedimiento**

Se tomó 1 mL de eritrocitos lavados y se hemolizaron con 1 mL de agua bidestilada fría. Se dejó reposar en baño de hielo por 15 minutos. Luego se tomó 0,5 mL para la determinación de MDA. El resto del hemolizado se utilizó para determinar los gramos de hemoglobina por litro. (\*)

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Longitud de onda: 532 nm
- Cubeta: 1 cm de espesor
- Temperatura: 60 °C y 95 °C

<b>Muestra (hemolizado)*</b>	0.500
<b>BHT 0.2 %</b>	0,040 mL
<b>NaOH 12.5 N</b>	0,020 mL
Incubar por 30 min a 60° C	
<b>TCA 18 %</b>	1.20 mL
Baño de hielo por 10 min	
Centrifugar (3500 rpm por 10 min)	
<b>Sobrenadante</b>	1 mL
<b>TBA 0.6 %</b>	0.500 ml
Incubar por 30 min a 95 °C	
Leer a 532 nm	

#### 3.4.4 Cálculos

$$MDA = \frac{Ab_{SMP} - Ab_{SBL}}{\epsilon} \times \frac{1}{V_R} \times \frac{1}{g \text{ Hb/L}} \times 10^9 \text{ nmol}$$

Dónde:

$Ab_{SMP}$  : Absorbancia de la muestra problema

$Ab_{SBL}$  : Absorbancia del blanco

$\epsilon$  : Coeficiente de extinción de MDA ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$V_R$  : Volumen real

$g \text{ Hb/L}$  : gramos de hemoglobina por litro

### 3.5 DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA (Hb)

#### 3.5.1 Método

Para la determinación de la hemoglobina se utilizó el método de la cianometahemoglobina. Se utilizó el kit Valtek para determinación cuantitativa en sangre. Se

fundamenta en que los eritrocitos son lisados por acción de un agente tensioactivo presente en el reactivo, liberando su contenido de hemoglobina en la solución. La hemoglobina liberada es oxidada por el ferricianuro, produciendo metahemoglobina que reacciona con el cianuro, dando cianometahemoglobina, compuesto estable cuyo pico máximo de absorción es a 540 nm, siendo la intensidad de color obtenido directamente proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra.

### **3.5.2 Reactivos**

- Solución estándar: Metahemoglobina disuelta en reactivo de Drabkin.
- Reactivo de Hemoglobina:
  - Ferricianuro de potasio
  - Cianuro de potasio
  - Sterox-SE
  - Buffer y estabilizantes no reactivos

### **3.5.3 Procedimiento**

#### **3.5.3.1 Preparación del reactivo de trabajo**

Se diluyó el reactivo 1:10 con agua destilada antes de usarlo. La solución estándar se provee lista para su uso, medir su absorbancia directamente contra el blanco reactivo.

#### **3.5.3.2 Preparación de la muestra**

Se utilizó *pipeta Sahli* y tres tubos de lectura identificados como blanco, estándar y muestra problema. Se trabajó por duplicado colocando lo siguiente:

	<b>B</b>	<b>St</b>	<b>MP</b>
<b>Sangre</b>	-	-	0,020 mL
<b>Estándar</b>	-	0,020 mL	-
<b>Reactivo</b>	5 mL	5 mL	5 mL

Se mezcló y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se leyó las absorbancias a 540 nm llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo.

#### 3.5.4 Cálculos

$$\text{Hemoglobina (g/dL)} = \text{Factor} \times \text{Absorbancia MP}$$

Donde:

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración St}}{\text{Absorbancia St}}$$



## IV. RESULTADOS

Del estudio de las enzimas antioxidantes eritrocitarias en sujetos de Nueva Cajamarca (Región San Martín) y Lima se obtuvieron los siguientes resultados:

- Las Tablas 7 y 8 muestran los valores hallados para las enzimas: Catalasa y Superóxido Dismutasa respectivamente; determinados en eritrocitos de sujetos residentes en Nueva Cajamarca (Región San Martín) y Lima.
- Los Gráficos 1 y 2 muestran los valores promedio para cada una de las enzimas antioxidantes en ambos grupos de estudio.
- La Tabla 9 muestra los valores de Malondialdehído como indicador de la peroxidación lipídica en eritrocitos de sujetos residentes de Nueva Cajamarca y Lima.
- El Gráfico 3 muestra el valor promedio de los niveles de MDA para cada grupo de estudio.
- La Tabla 10 muestra los parámetros estadísticos de CAT, SOD y MDA en ambos grupos de estudio.

### 4.1 Catalasa

Los valores medios de la actividad de la enzima CAT en Nueva Cajamarca fueron ligeramente mayores ( $0,61 \pm 0,10$  k CAT / g Hb) que en Lima ( $0,57 \pm 0,16$  k CAT / g Hb), ( $p < 0,025$ ).

### 4.2 Superóxido Dismutasa

Los valores medios de la actividad de la enzima SOD en Nueva Cajamarca fueron mayores ( $2142,00 \pm 2685,07$  U SOD / g Hb) que en Lima ( $1536,62 \pm 594,18$  U SOD / g Hb), aunque sin diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

### **4.3 Malondialdehído**

Los resultados de los valores medios de MDA en Nueva Cajamarca fueron ligeramente mayores ( $11,55 \pm 4,68$   $\eta\text{mol MDA} / \text{g Hb}$ ) que los obtenidos en Lima ( $11,11 \pm 3,99$   $\eta\text{mol MDA} / \text{g Hb}$ ), ( $p = \text{NS}$ ).

**Tabla 7**

**Niveles de Actividad de la Enzima Catalasa en Eritrocitos de Sujetos de Nueva  
Cajamarca y Lima**

N° de Muestra	CAT ( <i>k</i> / g Hb)	
	Nueva Cajamarca	Lima
1	0.59	0.59
2	0.51	0.86
3	0.77	0.46
4	0.61	0.45
5	0.62	0.37
6	0.50	0.56
7	0.57	0.50
8	0.51	0.37
9	0.72	0.51
10	0.62	0.58
11	0.61	0.69
12	0.66	0.50
13	0.82	0.82
14	0.44	0.52
15	0.39	0.69
16	0.60	0.42
17	0.65	0.49
18	0.69	0.58
19	0.57	0.68
20	0.72	0.41
21	0.67	0.45
22	0.56	1.02
23	0.62	0.40
24	0.64	0.67
<b>PROMEDIO</b>	<b>0.61</b>	<b>0.57</b>

**Tabla 8**

**Niveles de la Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa en Eritrocitos de Sujetos de  
Nueva Cajamarca y Lima**

N° de Muestra	SOD (U / g Hb)	
	Nueva Cajamarca	Lima
1	487.59	2914.17
2	254.23	3183.13
3	524.40	1216.92
4	2503.50	1444.75
5	8396.24	1245.31
6	703.78	801.90
7	322.25	1581.49
8	502.53	1659.92
9	503.21	1992.46
10	1523.83	1757.19
11	1343.41	1225.37
12	2752.85	1010.33
13	1359.66	1400.57
14	1995.48	2061.48
15	11683.77	1147.04
16	4767.43	997.81
17	654.30	1249.84
18	2388.85	1015.59
19	2315.03	1051.99
20	2115.21	1409.62
21	779.63	1940.45
22	1284.08	2139.45
23	1150.78	1383.07
24	1112.90	1048.95
<b>PROMEDIO</b>	<b>2142.71</b>	<b>1536.62</b>

**Tabla 9**

**Niveles de Malondialdehído en Eritrocitos de Sujetos de  
Nueva Cajamarca y Lima**

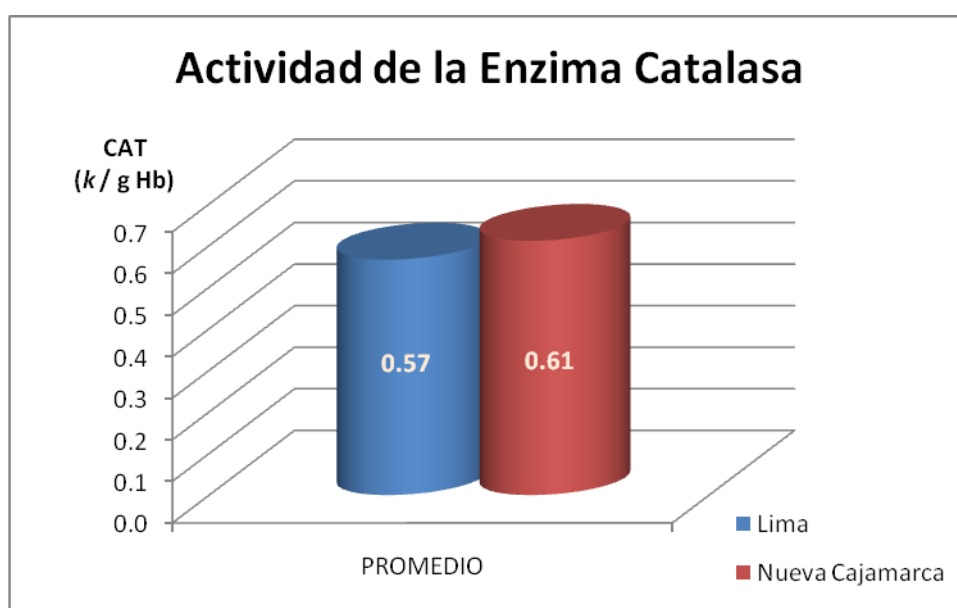
<b>N° de Muestra</b>	<b>MDA (nmol / g Hb)</b>	
	<b>Nueva Cajamarca</b>	<b>Lima</b>
1	9.17	8.10
2	17.60	5.59
3	10.49	20.24
4	6.19	13.23
5	7.62	6.55
6	11.97	11.82
7	14.45	7.23
8	13.59	15.43
9	9.31	12.22
10	28.33	14.06
11	9.61	7.83
12	13.34	6.46
13	17.73	13.98
14	12.81	11.63
15	6.89	6.83
16	11.67	7.90
17	7.90	9.77
18	13.09	12.96
19	9.06	8.15
20	8.78	11.14
21	9.36	12.25
22	8.47	20.51
23	9.94	11.98
24	9.94	10.81
<b>PROMEDIO</b>	<b>11.55</b>	<b>11.11</b>

**Tabla 10**

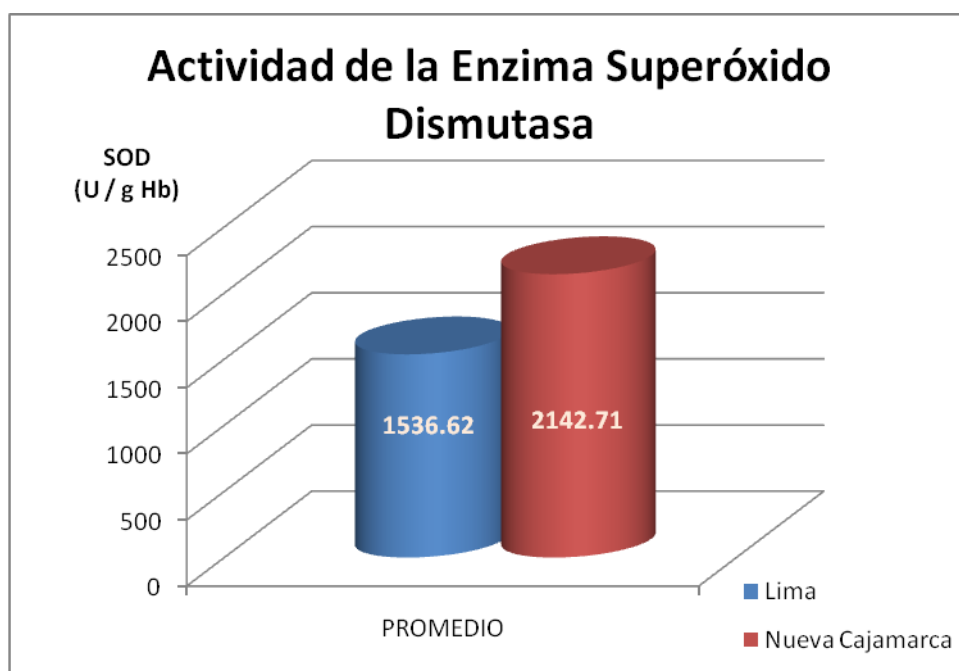
**Parámetros Estadísticos de Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT)  
y Malondialdehído (MDA)**

	LIMA		NUEVA CAJAMARCA		p
	n = 24		n = 24		
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	
CAT (k / g Hb)	0.57	0.16	0.61	0.10	< 0.025
SOD (U / g Hb)	1536.62	594.18	2142.00	2685.07	NS
MDA (ηmol / g Hb)	11.11	3.99	11.55	4.68	NS

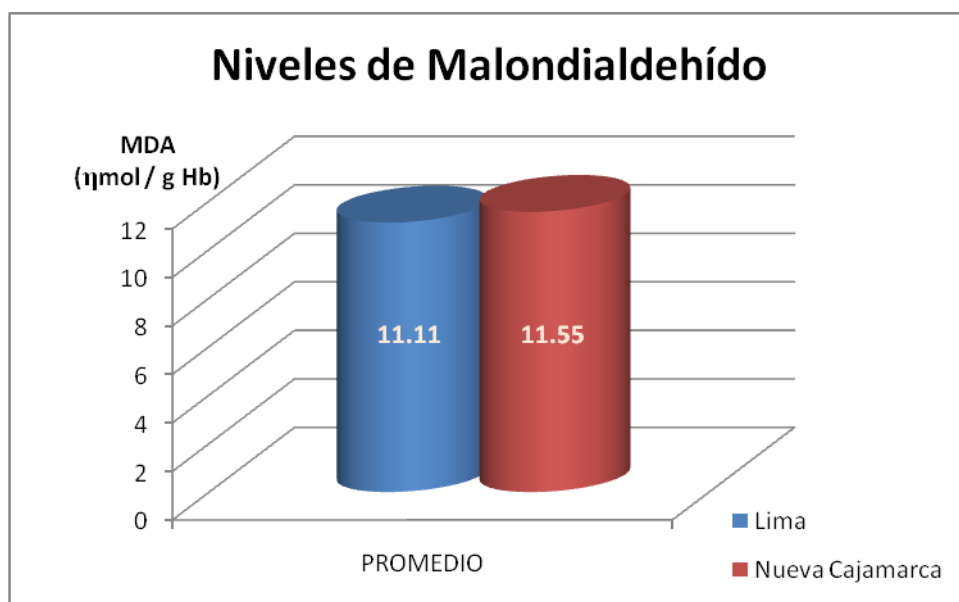
**Gráfico 1**



**Gráfico 2**



**Gráfico 3**



## V. DISCUSIÓN

La vida media de los radicales libres es muy corta, y por lo tanto su cuantificación directa no es posible, por este motivo se utilizan marcadores indirectos de sus efectos. Para el estudio de la oxidación lipídica los marcadores más utilizados son el malondialdehído (MDA) y las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) <sup>37, 38</sup>.

Los eritrocitos son susceptibles a lesiones oxidativas en función del alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y a las altas concentraciones intracelulares de oxígeno y hemoglobina, que son promotores potenciales de procesos oxidativos. A pesar de todo, los eritrocitos contienen muchas enzimas antioxidantes, tales como la SOD, glutatión peroxidasa y catalasa, además de antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas C y E, y el glutatión <sup>39</sup>. De este modo, los eritrocitos se presentan como marcadores biológicos de agresiones tóxicas y oxidantes en diferentes órganos y sistemas <sup>40</sup>. Por ello se evaluó el nivel de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) y la concentración de malondialdehído (MDA) en eritrocitos.

El nivel de estrés oxidativo depende de la velocidad de generación de oxidantes y de los niveles de defensa antioxidante, los cuales están genéticamente controlados, pero están influenciados también por factores epigenéticos <sup>41</sup>. Esto sugiere la existencia de determinados factores en el medio ambiente que influirían en la elevación o disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes.

La menor actividad de la enzima catalasa en los sujetos de Lima respecto a los sujetos de Nueva Cajamarca fue estadísticamente significativa, esto puede estar relacionado con el hecho de que la enzima SOD tiene también más baja actividad en este grupo. Esta última es la encargada de convertir el radical superóxido en  $H_2O_2$  y  $O_2$  molecular por medio de una reacción de dismutación. Su alta constante específica de velocidad hace que se acumulen altas concentraciones de  $H_2O_2$ , como se ha discutido ampliamente en varios trabajos <sup>42, 43</sup>. Al acumularse esta sustancia se activa la enzima catalasa, por ser insuficiente la acción que la



otra enzima encargada de la eliminación de peróxidos (glutación peroxidasa) puede ejercer para mantener los niveles adecuados de esta especie reactiva. Si disminuye la actividad de la SOD, se acumulan cantidades de radical superóxido porque la conversión de éstos a peróxidos tiene lugar a una velocidad 105 veces menor y altas concentraciones de radical superóxido inhiben a la enzima catalasa <sup>44</sup>.

La catalasa sufre alteraciones en su actividad en función de la dieta. Una dieta puede llevar a una disminución de la actividad de la catalasa si ella provee al organismo moléculas antioxidantes capaces de eliminar radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. Al mismo tiempo, algunos suplementos alimenticios, como la naringina, flavonoide reductor de los niveles de lípidos plasmáticos, y la vitamina C, pueden llevar a una protección antioxidante por un mecanismo opuesto, elevando la actividad catalásica <sup>39</sup>. Estos datos sugieren que algunos factores antioxidantes de la dieta pueden ser responsables por esa respuesta.

La actividad catalásica también ha sido usada para detectar alteraciones del status oxidativo en deportistas. La catalasa puede sufrir una inactivación parcial como resultado de una oxidación del hierro (Fe IV) presente en su estructura. El ejercicio puede elevar la actividad catalásica y se supone que, la producción de radicales superóxido durante el ejercicio es el factor responsable por esa elevación. El anión radical superóxido reacciona con el hierro de esa enzima, manteniéndolo en la forma activa de Fe III <sup>39</sup>.

La disminución de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en los sujetos de Lima respecto a la de los sujetos de Nueva Cajamarca no fue estadísticamente significativa. Pero, se ha demostrado que la actividad baja de esta enzima es consecuencia de los elevados niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido durante la reacción, que inhibe a la enzima por retroalimentación negativa. En efecto, se ha observado que inicialmente se produce un incremento de la SOD, como respuesta a la elevada generación del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en la célula y su eliminación por la enzima; sin embargo, la intensa producción de este radical por un tiempo prolongado, agota la estimulación de la actividad enzimática, ya que el producto de la reacción puede inhibirla <sup>45</sup>. Esta disminución de la actividad podría deberse a que en la ciudad

de Lima existe exposición constante a mayor cantidad de radiaciones, elevado índice de contaminación de hidrocarburos, presencia de metales pesados y óxido nitroso que en la ciudad de Nueva Cajamarca. Asimismo, las personas que viven en Nueva Cajamarca tienen un estilo de vida distinto al habitante de Lima: menor consumo de tabaco y alcohol, mayor actividad física y un menor nivel de estrés. Estos factores condicionarían una mayor respuesta frente a la oxidación en el habitante de Nueva Cajamarca <sup>46</sup>.

Además, el habitante de Nueva Cajamarca incluye vegetales y frutas en su alimentación en mayor frecuencia que los habitantes de Lima, lo cual le permite mejorar una respuesta oxidante. Esto se relaciona con algunos estudios en los cuales se señala que el aumento de la ingesta de hortalizas, frutas y zumos de frutas reduce la peroxidación lipídica. Wise et al. estudiaron los efectos de suplementos de extracto de frutas y vegetales sobre las concentraciones de peroxidación lipídica en 15 individuos durante 4 semanas. Los suplementos incluían vegetales secos, extractos de zanahorias, perejil, remolacha, espinaca, tomates, zumo de frutas, manzanas y papayas. La concentración de peróxido lipídico en el plasma de los 15 individuos disminuyó de 16,85 a 3,13  $\mu\text{mol/L}$  en la primera semana y permaneció en este nivel durante las tres semanas restantes del experimento <sup>39</sup>.

La desviación estándar de los valores de actividad de la enzima SOD es elevado si se compara con el valor de las medias en cada grupo. Otros autores <sup>47</sup> han reportado elevados valores de este indicador estadístico que se puede explicar por la gran variación que existe en la población sana en la actividad de esta enzima <sup>48-50</sup>.

La bibliografía no reporta valores normales de referencia para malondialdehído (MDA) en eritrocitos, los valores dependen del método de determinación. Distintos procedimientos dan diferentes resultados en los ensayos <sup>51, 52</sup>. Los niveles de malondialdehído (MDA) son ligeramente elevados en los sujetos de Nueva Cajamarca aunque sin significancia estadística, esto se debe a que los habitantes de Nueva Cajamarca realizan actividades físicas que requieren de mayor esfuerzo como por ejemplo la agricultura. Esto se sustenta en estudios en los cuales se señala que durante la práctica de una actividad física se produce un aumento

del consumo de oxígeno, que se traduce en una mayor formación de radicales libres; este aumento puede ser tan importante que sobrepase la acción de los sistemas antioxidantes, produciéndose un aumento de los procesos de oxidación, entre ellos de la oxidación lipídica<sup>53, 54</sup>.

El presente estudio destaca la importancia de la respuesta antioxidante enzimática de los residentes de Nueva Cajamarca; sin embargo, es necesario el incremento de estudios que permitan complementar la relación con la respuesta antioxidante no enzimática frente a los radicales libres y el estrés oxidativo.

## VI. CONCLUSIONES

Del estudio de las actividades de las enzimas antioxidantes eritrocitarias: la superóxido dismutasa y catalasa, y la determinación de la concentración malondialdehído como indicador de la peroxidación lipídica en sujetos residentes de Nueva Cajamarca y de Lima, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Los niveles eritrocitarios de catalasa en los sujetos de Nueva Cajamarca fueron ligeramente mayores que los de Lima ( $p < 0,025$ ).
2. Los niveles de superóxido dismutasa en eritrocitos de los sujetos de Nueva Cajamarca se encuentran elevados respecto a los de Lima, pero sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ).
3. Los niveles de malondialdehído son similares en ambas poblaciones, aunque sin significancia estadística ( $p > 0,05$ ).

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Evaluar la respuesta enzimática antioxidante según niveles de contaminación ambiental.
2. Evaluar la respuesta enzimática antioxidante relacionando dieta, suplementos alimenticios y ejercicio.
3. Evaluar cuán determinantes son las respuestas antioxidantes no enzimáticas frente al daño oxidativo.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez P, Pérez J. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*. 2000; 29 (3): 192 – 198.
2. Trejo J. Efecto del ácido clorogénico sobre la actividad de enzimas antioxidantes en enterocitos de rata. Tesis de Licenciatura en Química. UACD, Instituto de Ciencias Biomédicas. Ciudad de Juárez, 2009.
3. Del Castillo I. Antioxidantes, radicales libres y envejecimiento. [revista en internet]. [citado 2010 Jun 27]; [1 página]. Disponible en:  
[http://www.holistika.net/nutricion/articulos/antioxidantes\\_radicales\\_libres\\_y\\_envejecimiento.asp](http://www.holistika.net/nutricion/articulos/antioxidantes_radicales_libres_y_envejecimiento.asp)
4. Aldred S. Oxidative and nitrative changes seen in lipoproteins following Exercise. *Journal of Atherosclerosis*. 2007; 192 (1): 1 – 8.
5. Oficina Nacional de Gobierno Electrónico e Informática. Portal municipal del Perú. [en internet]. [citado 2010 Abr 06]; [1 página]. Disponible en:  
[http://www.peru.gob.pe/pm/portales/portal\\_municipal/entidad/PM\\_MUNICIPALIDAD.asp?pk\\_id\\_entidad=1790](http://www.peru.gob.pe/pm/portales/portal_municipal/entidad/PM_MUNICIPALIDAD.asp?pk_id_entidad=1790)
6. Rodriguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativa. *Revista Cubana Médica Militar*. 2001; 30 (1): 36 – 44.
7. Fleschin S, Fleschin M, Nita S, Pavel E, Magearu V. Free radicals mediated proteins oxidation in biochemistry Roum. *Biotechnol. Lett*. 2000; 5 (6): 479 – 795.
8. Depeng W, Cederbaum A. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Research & Health*. 2003; 27 (4): 277 – 284.
9. Lozada M, García L. Estrés oxidativo y antioxidante: cómo mantener el equilibrio. *Rev Asoc Colomb Dermatol*. 2009; 17: 172 – 179.

10. Delatre J, Bonnefont-Rousselot D. Oxidative Stress, Free Radicals and aging. Biotech Lab. Int. 1998; 3 (2): 21 – 23.
11. Adiazola M, Olivera P. Antioxidantes eritrocitarios en sujetos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2005.
12. Venereo J. Daño Oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. Revista Cubana Médica Militar. 2002; 31 (2):126 – 133.
13. Roche. Patología de los radicales libres y su prevención con vitaminas antioxidantes; el  $\beta$ -caroteno, la vitamina E y la vitamina C en la profilaxis de las enfermedades. Doc. Tec. 12p(p3-9)
14. Turrens J. Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. Antioxidantes y Calidad de Vida. 1994; 1: 16-19.
15. Rodriguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Revista Cubana Médica Militar. 2001; 30 (1): 15 – 20.
16. Pérez D. Seminario de radicales libres. Instituto Biológico de la Salud. [en internet]. [citado 2010 Jun 06]; [8 páginas]. Disponible en:  
<http://www.institutobiologico.com/seminarios/radicales%20libres.htm>
17. Zemba C. Medicina antiaging. Revista Laboratorios Thea. 2007; 17 (1): 01 – 39.
18. Gambini J. Efecto del estradiol y otros compuestos estrogénicos sobre la expresión de genes asociados a la longevidad. Tesis para optar el título de Doctor en Farmacia. Universidad de Valencia, Facultad de Medicina y Odontología. Valencia, 2007.
19. Mayes P. Oxidación Biológica. En: Granner D, Mayes P, Murria R, Rodwell V. Bioquímica de Harper. México D.F.: El Manual Moderno. 1999; pp: 135 - 142.
20. Halliwell B, Gutteridge J. The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems. Trends Biochemical Science. 1990; 15: 129 – 135.
21. Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th Edition; Oxford: 1999.

22. Tank L, Zhang Y, Qian Z, Shen X. The Mechanism of  $\text{Fe}^{+2}$  initiated Lipid Peroxidation in Liposomes: The dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. *Journal of Biochemical*. 2000; 352 (1): 27 – 36.
23. Södergren E. Lipid Peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*. 2000; 949 (78)
24. Tiskow G. Radicales Libres en Biología y Medicina: Una breve revisión. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*. 1996; Año 2 (1): 44 – 57.
25. Halliwell B, Gutteridge J. Lipid Peroxidation: A radical chain reaction. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press; 1989. pp. 188 – 266.
26. Block G. A role of antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr. Res*. 1992; SO: 207 – 213.
27. Gil del Valle L, Reyes A, Sánchez G, Fernández O. Terapia Antioxidante en la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2002; 21 (4): 301 - 308.
28. Córdova A, Ruiz CG, Córdova CA, Córdova MS, Guerra JE, Rodríguez BE, et al. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2009; 3 (1): 01 – 38.
29. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem*. 1997; 43: 1209 – 1214.
30. Elejaldle JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*. 2001; 18 (6): 326 – 335.
31. Benito JD. Valoración del estrés oxidativo producido por el ejercicio físico inducido en dos grupos de varones prepuberales y puberales. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Departamento de Educación Artística y Corporal. Córdoba, 2008.
32. Ramírez I. Efecto de la administración oral de extractos vegetales con actividad antioxidante, sobre los niveles sanguíneos de glutatión peroxidasa en la rata. Tesis para



- optar el título de Química Bióloga. USCG, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 2004.
33. Noguchi N, Niki E. Chemistry of active oxygen species y antioxidants. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health*. 1999; pp: 03 – 20.
  34. Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *Anales de la Facultad de Medicina*. 1996; 57 (4): 278 – 281.
  35. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, Transition metals and disease. *J. Biol. Chem*. 1988; 263: 9692 – 96.
  36. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121 – 126.
  37. Vasankari T, Kujala U, Heinonen O, Kapanen J, Ahotupa M. Mesurement of serum lipid peroxidation during exercise using three different methods: diene conjugation, thiobarbituric acid reactive material and fluorescent chromolipids . *Clin Chim Acta*. 1995; 234: 63 – 69.
  38. Jenkins RR. Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr*. 1993; 3:356 – 375.
  39. Vásquez M, Dos Santos R, Ávila C, Barreto E, Villa GJ, Araújo LE. Dieta afro-bahiana, estrés oxidativo y ejercicio físico. *Rev Nutr*. 2006; 19 (6): 673 – 683.
  40. Aguilar R, Moraes T, Moraes G. Implicações do estresse oxidativo sobre o metabolismo eritrocitario de pessoas com Síndrome de Down. *Revista Brasileira de Hematología e Hemoterapia*. 2003; 25 (4).
  41. Céspedes E, Rodríguez K, Llopiz N, Cruz N. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2000; 19 (3): 186 – 90.
  42. Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2000; 23: 234 – 240.

43. Álvarez S. The mitochondria. Published in Antioxidants and life style. [en internet]. 2003 [citado 2010 Jul 27]. Disponible en: [www.antioxidants.com.ar](http://www.antioxidants.com.ar)
44. Pieper GM, Jordan N, Dondlinger LA. Peroxidative stress in diabetic blood vessel. Diabetes. 1995; 44: 884 – 885.
45. Bravo A, Araujo S, Vargas ME, Mesa J, Souky A, Bermúdez V, et al. Actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa y niveles de cobre y zinc en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 2007; 26 (01): 01 – 08.
46. Seclén S, Baracco R, Mohanna S. Antioxidantes en poblaciones adultas del nivel del mar y de grandes alturas: actividad de la superóxido dismutasa. Rev Med Hered. 2006; 17 (1): 04 – 07.
47. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Vessby B. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus. J Internal Med 2002; 251:69-76.
48. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinye M, Domínguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. Free Radical Biol Med. 2003; 34 (12): 1563 – 74.
49. Baynes JW, Thorpe SR. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. Drugs Aging. 1996; 9 (2): 69 – 77.
50. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek J, Trefil L, Pomahacova R. Parameters of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus and their relatives. J Diabetic Complic. 2003; 17: 7 – 10.
51. Vicente M, Miñano M. Determinación de algunos antioxidantes en sujetos de altura. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, 2002.
52. Hong Y, Yeh S, Chang C, Hu M. Total plasma malondialdehyde levels in 16 taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid test and an improved - High

Performance Liquid Chromatography – based method. *Clinical Biochemistry*. 2000; 33 (8): 619 – 625.

53. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982; 107: 1198 – 1205.
54. Salinas J, García L, Chima MC, Suástegui S, Rivera ME, Cruz L. Determinación de la concentración de malondialdehído y la actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos. *Rev Mex Patol Clin*. 2009; 56 (4): 223-234.